IMPERIAL ENTOMOLOGICAL
JUL 1947
INSTITUTE

Vol. 17 1946

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

• Departamento da Defesa Sanitária da Agricultura •

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

Os Arquivos do Instituto Biologico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em numero limitado, são obtidos apenas por permuta.

Toda correspondencia referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor Geral do Instituto Biologico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 119-A, São Paulo, Brasil.

Diretor Geral: Prof. Dr. H. da Rocha Lima.

The "Arquivos do Instituto Biologico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles, a limited number of which is printed, may be obtained by exchange.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Diretor Geral do Instituto Biologico, P. O. Box 119-A - São Paulo, Brazil.

PREÇO DESTE NUMERO CR$ 50,00

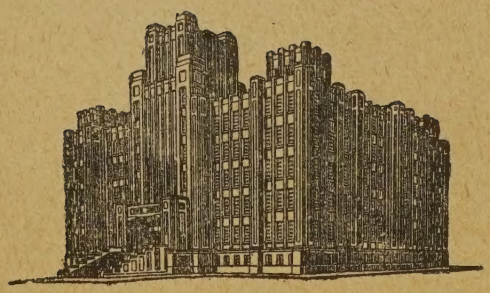
Vol. 17 1946

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

• Departamento da Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMÁRIO

Pags.

1. **Orlando, A. e K. Silberschmidt** — ESTUDOS SÔBRE A DISSEMINAÇÃO NATURAL DO VIRUS DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS (ABUTILON VIRUS 1. BAUR) E SUA RELAÇÃO COM O INSETO-VETOR "BEMISIA TABACI (GENN.)". (HOMOPTERA-ALEYRODIDAE) — Com 2 figuras no texto.
Studies on the Natural Dissemination of the Virus of the "Infectious Chlorosis" of Malvaceae (Abutilon Virus 1. BAUR) *and its Relation to the Insect-Vector "Bemisia tabaci* (GENN.)". *(Homoptera-Aleyrodidae)* 1-36

2. **Lepage, H. S. e O. Giannotti** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS COCCÍDEOS DO BRASIL (HOMOPTERA-COCCOIDEA) — Com 20 figuras no texto.
Contribution to the Knowledge of Brazilian Coccidae (Homoptera-Coccoidea) 37-46

3. **Jenkins, Anna E. e A. A. Bitancourt** — OBSERVAÇÕES SÔBRE ESPÉCIES DO GÊNERO "ELSINOË" DE UGANDA — Estampas 1-2.
Observations on Species of the Genus "Elsinoë" from Uganda 47-54

4. **Thirumalacher, M. J.** — DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS DOS GÊNEROS "ELSINOË" E "SPHACELOMA" EM MISORE (SUL DA INDIA) — Com 8 figuras no texto.
Records of "Elsinoë" and "Sphaceloma" Diseases in Mysore (South India) 55-66

5. **Jenkins, Anna E. e A. A. Bitancourt** — DUAS VERRUGOSES DO CHÁ, CAUSADAS POR "ELSINOË", E SUA DISTRIBUIÇÃO — Estampa 3.
Two Scab Diseases of Tea caused by "Elsinoë", and their Distribution 67-72

6. **Guida, V. O. e C. Rodrigues** — SÔBRE A INFLUÊNCIA DO "CLOSTRIDIUM SPOROGENES" NA TOXINOGENESE TETÂNICA.
On the Influence of "Cl. sporogenes" upon Tetanus Toxin Production 73-97

7. **Kramer, M. e K. Silberschmidt** — PESQUISAS ACERCA DA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS VEGETAIS EM PLANTAS DA FLORA SUBTROPICAL — Com 20 figuras no texto e estampas 4-5.
Research concerning Growth Hormone Determinations in Subtropical Plants 99-148

(CONTINUA)

Pags.

8. **Castro, M. P. de e C. Pereira** — ALIMENTAÇÃO DAS PROTERONINFAS DE "BOOPHILUS (UROBOOPHILUS) MICROPLUS CAN., 1888" (IXODIDAE) COM OS RESTOS NECRÓTICOS DA REAÇÃO TISSULAR DO HOSPEDEIRO — Com 1 figura no texto e estampas 6-11.
The feeding of "Boophilus (Uroboophilus) microplus CAN., *1888" (Ixodidae) on the necrotic débris of tissular reaction of the host.* 149-162

9. **Meyer, J. R.** — TENTATIVAS PARA SEPARAÇÃO DA SUBSTÂNCIA ANTINEOPLÁSICA QUE SE FORMA NOS LÍQUIDOS DE CULTURA DE "PENICILLIUM NOTATUM".
Attempts to separate the Antineoplastic Substance formed in Cultures of "Penicillium notatum" in CZAPEK-DOX *Medium* . . 163-173

10. **Meyer, J. R. e H. Cerruti** — AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DO "POLYPORUS CINNABARINUS" DEMONSTRADA "IN VITRO" COM UM TUMOR TRANSPLANTAVEL DO CAMONDONGO.
Anti-neoplastic Activity of "Polyporus cinnabarinus", demonstrated "in vitro", on a Transplantable Tumor of the Mouse . . 175-181

11. **Carneiro, V.** — NOVOS FOCOS DE ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO EM SÃO PAULO, IDENTIFICADOS PELAS PROVAS DE SÔRO-NEUTRALISAÇÃO.
Four new foci of Equine Encephalomyelitis in São Paulo identified by tests of Serum-neutralisation 183-198

12. **Nobrega, P. e R. C. Bueno** — SÔBRE A AÇÃO DA PENICILINA NA ESPIROQUETOSE DE PINTOS E AVES ADULTAS
On the Treatment of Chicks and Fowl Spirochetosis with Penicillin 199-204

13. **Bitancourt, A. A. e Anna E. Jenkins** — A VERRUGOSE DA MANGUEIRA — Estampas 12-14.
Mango Scab 205-228

14. **Araujo, R. L.** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO GÊNERO "PROTONECTARINA DUCKE, 1910" (HYM.-VESPIDAE) — Estampa 15.
Contribution to the Knowledge of the Genus "Protonectarina DUCKE, *1910" (Hym.-Vespidae)* 229-238

15. **Penha, A. M. e M. D'Apice** — CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ENTERITE INFECCIOSA DOS BEZERROS. I. IMPORTANCIA DA "SALMONELLA DUBLIN" NA ETIOLOGIA DESSA MOLESTIA EM SÃO PAULO — Estampas 16-17.
Studies on Infectious Diarrhea of Calves. I. The Importance of "Salmonella dublin" as a cause of that Disease in the State of São Paulo 239-248

(CONTINUA)

Pags.

16. **Lepage, H. S., O. Giannotti** e **A. Orlando** — TOXIDÊZ DOS CONSTITUINTES DAS SEMENTES DE "PACHYRRHIZUS TUBEROSUS (LAM.) SPRENG." VAR. VERMELHA, PARA O AFÍDEO "BREVICORYNE BRASSICAE L." (HOMOPTERA-APHIDIDAE) — Estampas 18-21.
Toxicity of the Constituents of the Seeds of "Pachyrrhizus tuberosus (LAM.) SPRENG." *red variety, for the Aphid "Brevicoryne brassicae L." (Homoptera-Aphididae)* 249-258

17. **Mello, M. J. de** e **C. Pereira** — DETERMINISMO DA EVASÃO DAS LARVAS DE "HABRONEMA" SP. DA TROMBA DA MOSCA DOMESTICA — Com 1 figura no texto.
Determinism of the Evasion of the Larvae of "Habronema" sp. from the Proboscis of the Domestic Fly 259-266

18. **Pereira, C.** e **M. P. de Castro** — SÔBRE O EQUILÍBRIO GENÉTICO ESTAVEL.
On the Stability of the Genetic Equilibrium 267-268

19. **Carneiro, V.** — ENCEFALOMIELITES INFECCIOSAS DOS EQUÍDEOS — Estampas 22-28.
Infectious Encephalomyelitis of Horses 269-330

———o———

Vol. 17 — Art. 1 Setembro de 1946

ESTUDOS SÔBRE A DISSEMINAÇÃO NATURAL DO VIRUS DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS (ABUTILON VIRUS 1. BAUR) E A SUA RELAÇÃO COM O INSETO-VETOR "BEMISIA TABACI (GENN.)". (HOMOPTERA-ALEYRODIDAE)

POR

A. Orlando e K. Silberschmidt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

I — INTRODUÇÃO

O problema da transmissão natural da "clorose infecciosa" das Malváceas vem prendendo já quase há um século, o interesse dos pesquisadores. Esse interesse relaciona-se parcialmente com o caráter pronunciado e até ornamental dos sintomas que a doença provoca nas plantas atacadas, caráter que durante muito tempo dificultou a distinção da "clorose infecciosa" de anomalias genéticas do tipo de "variegações". Explica-se por outro lado o interesse dispensado ao problema de transmissão natural da "clorose infecciosa", pela impossibilidade afirmada durante muitos anos pelos pesquisadores, de se transmitir experimentalmente a doença por outros métodos a não ser o da enxertia. Tornou-se, assim, a "clorose infecciosa" o protótipo de um grupo de doenças de virus considerado transmissivel apenas por enxertia e cuja constante disseminação entre plantas de vegetação espontânea dificilmente podia ser compreendida. Diante de tal dificuldade, de explicar razoavelmente a transmissão da doença, não é de extranhar que vários autores encarassem a possibilidade de originar-se o virus causador da doença, ou de doenças de carateres semelhantes, "espontâneamente" da proteina da própria planta hospedeira, isto é, sem intervenção de um parasita externo. Tais idéias acham-se expostas ou pelo menos referidas nos trabalhos de BAUR (7-8, 1904, 06), MORITZ em KRENKE (47, 1933), WOODS e DU BUY (89-90, 1943) e DARLINGTON (23, 1944).

A relação que assim se supôs existir entre o problema da disseminação natural da "clorose infecciosa" e a questão da natureza dos agentes causadores das doenças de virus em geral, contribuiu, tanto em outros países como no Brasil, para estimular a realização de estudos da referida doença das Malváceas. Entre nós, a "clorose infecciosa"

foi estudada por SILBERSCHMIDT (69, 1943), que demonstrou que uma doença clorótica por ele observada em muitas malváceas do gênero *Sida*, que fazem parte da vegetação espontânea dos arredores da capital do Estado de São Paulo, é causada por um virus idêntico ao agente causador da doença chamada "clorose infecciosa" isto é, ao *Abutilon virus* 1. BAUR. Essas conclusões basearam-se em estudos da transmissão experimental desta doença, especialmente por meio de enxertia. Uma vês que se tinha verificado, por esses estudos, a ocorrência abundante de plantas atacadas por "clorose infecciosa" nas imediações do nosso próprio Instituto, fomos levados a acreditar que dispunhamos também de condições muito favoráveis para atacar o problema da disseminação natural da doença. Realizando observações nesse assunto, esperávamos poder ao mesmo tempo esclarecer a importância econômica da doença, visando especialmente averiguar a eventual existência de uma relação entre ela e certas doenças de plantas cultivadas.

Em uma nota prévia (58, 1945) já referimos os resultados preliminares que conseguimos relativamente à transmissão do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por insetos pertencentes à familia *Aleyrodidae*. No presente trabalho procuramos confirmar por experiências mais amplas e efetuadas em bases mais exatas, as primeiras observações, sendo aqui definitivamente determinado como vetor do virus em questão o aleirodídeo *Bemisia tabaci* (GENN.) (= *B. gossypiperda* MISRA e LAMBA).

Incluimos também em nossas experiências atuais, além das plantas da espécie *Sida rhombifolia* L., que em nosso meio se apresentam comumente atacadas pelo *Abutilon virus* 1. (69, 1943), uma outra malvácea, da espécie *Abutilon striatum* var. *spurium*, que pertence ao gênero em que a doença foi pela primeira vês constatada e tem sido mais intensivamente estudada.

Neste trabalho ainda nos referiremos às experiências que realizamos com o fim de determinar préviamente a relação dos insetos em geral com a doença em estudo e aos resultados que obtivemos relativamente ao número mínimo de aleirodídeos necessário para propagação do virus em estudo.

As espécies de insetos e ácaro, testadas em nosso estudo e que se acham referidas na tabela 1 desse nosso trabalho, sob os números 1 e 2, 3 a 11, 12 a 15, 16 e 18, 17, 19 a 20 e 21, foram gentilmente classificadas respectivamente pelos Snrs: CARLOS H. REINIGER (Ministério da Agricultura), J. S. CALDWELL (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), A. DA COSTA LIMA (Escola Nacional de

Agronomia), OSCAR MONTE (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura), R. I. SAILER (Departamento de Agricultura, U. S. Nat. Museum), J. C. CRAWFORD (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) e MARIA P. DE CASTRO (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura).

O aleirodídeo *Bemisia tabaci* (GENN.) foi gentilmente determinado por Miss LOUISE M. RUSSELL, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

A todos os especialistas acima citados consignamos aqui nossos melhores agradecimentos.

Agradecemos ainda ao Snr. RENATO L. ARAUJO, assistente do Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura, a indicação e remessa dos insetos aos especialistas competentes; e ao Snr. PAULO CORRÊA, auxiliar de laboratório do mesmo Departamento, a colaboração prestada na execução dos nossos ensáios.

II — LITERATURA

Neste capitulo tentamos fazer um breve apanhado dos principais trabalhos que de alguma forma se referem à provavel transmissibilidade ou intransmissibilidade do virus da "clorose infecciosa" das malváceas (*Abutilon virus* 1. BAUR.) por insetos, aduzindo ainda as citações da literatura relacionadas com a propagação dos virus em geral por representantes da família *Aleyrodidae*, a qual pertence também o vetor por nós encontrado.

Com relação à questão da transmissibilidade propriamente dita, do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por insetos, não encontramos na literatura trabalho algum que se refira diretamente ao assunto. Encontramos, na verdade, uma longa série de trabalhos que tratam de estudos realizados com o virus em questão, mas que se relacionam com os aspétos de sintomatologia, propagação (principalmente enxertia e semente), anatomia, química, etc.

Entretanto existem na literatura referências, aliás numerosas e bem alicerçadas, apenas á provavel ou não propagação natural do referido virus por insetos em geral.

Portanto sómente essas últimas citações, que se prendem mais intimamente aos nossos estudos, é que procuraremos aqui reunir.

Podemos assim destacar aqui o trabalho de BAUR (7, 1904), que em estudos da etiologia dessa doença chegou a diferencia-la de anomalias de sintomatologia semelhantes mas de causa puramente genética. Mesmo assim, BAUR considerou como não provada a sua natureza infecciosa, e estabelece, nesse trabalho, que para uma doença

ser considerada infecciosa deve ter também meios naturais de expansão, ainda então desconhecidos, pois naquela época sómente fôra possivel transmiti-la por enxertia.

Contudo BAUR (8, 1906) defende uma teoria de virus como causa da "clorose infecciosa", mas não crê na expansão natural da doença e supõe que alguns casos de disseminação observados nas "East Indies" eram devidos à propagação das plantas doentes pelos habitantes da região para fins ornamentais.

Muitos anos depois as experiências de HERTZSCH (35, 1927) sôbre a "clorose infecciosa" levaram-no a concluir também que essa doença sómente é transmissivel por enxertia e não pela semente ou suco. Não observou, da mesma forma, transmissão natural da doença, de plantas doentes para sadías.

DAVIS (24, 1929), estudando os meios de transmissão e a natureza da doença em questão, obteve também resultados negativos com todos os métodos de transmissão excepto a enxertia. Nesse interessante trabalho entretanto, o autor já previa e referia a possibilidade da existência, nas regiões tropicais, de um inseto que regularmente infectasse as plantas de *Abutilon* com a "clorose infecciosa".

Em 1930 KUNKEL (49), referindo-se à transmissão de um mosáico de *Sida rhombifolia*, doença que acha semelhante à provocada pelo virus de *Abutilon striatum* var. *thompsoni*, refere que a sua propagação sómente se tornou possivel por enxertia.

EULER (27, 1931), em seu trabalho sôbre estudos químicos da "clorose infecciosa" de *A. striatum*, refere-se também à experiências realizadas em colaboração com W. HERTZSCH, que confirmaram as observações já referidas, de que a doença sómente é transmissivel pela enxertia.

COOK (18, 1931) cita a ocorrência, em Porto Rico, de uma variegação em *Abutilon hirtum* e *Sida* sp., que supomos seja provocada pelo mesmo agente causal da doença por nós estudada. Neste trabalho COOK confirma as primeiras previsões de DAVIS (24, 1929), referindo que as observações de campo mostram que a doença dissemina-se de planta para planta, e indicam que ela deve ser transmitida por insetos.

Ainda em 1931, ELZE (26), em uma tentativa para classificação das doenças de virus e de acôrdo com os conhecimentos da época, coloca o *"Abutilon mosaic"* no grupo das que ainda não foram transmitidas por insetos.

Num apanhado dos conhecimentos gerais da época relativos às doenças de virus das plantas, KÖHLER (45, 1932) julga poder

admitir com bastante certeza que o aparecimento natural da "clorose infecciosa" nos países européus só nunca foi observado, porque falta ali o inseto capaz de a transmitir. Baseia KÖHLER essas conclusões principalmente nas observações de COOK, antes citadas.

Os estudos de KEUR (39, 1933), ainda que hajam trazido novos conhecimentos quanto á transmissão da variegação de *Abutilon* pela semente, não se referiram a insetos. Em 1934, porém, KEUR (40), em seu trabalho sôbre a ocorrência e transmissão dessa mesma doença, além de confirmar a sua transmissíbilidade pela semente, refere que em seus estudos não foi conseguida evidência de uma transmissão por insetos e que os insetos que estão presentes nas estufas do "New York Botanical Garden" não agem como vetores dêsse virus. Sugere, por outro lado, muito acertadamente, e conforme DAVIS (24, 1929), que os insetos existentes nos países tropicais, onde muitas malváceas são indigenas, poderiam transmitir a doença; entretanto, ressalta o autor, até hoje nada foi realizado a esse respeito.

BOTERO (14, 1940) observou a ocorrência, frequente nas plantações de algodão da Colômbia, de plantas de *Sida acuta* BURN e *Sida salvaefolia* PREST, exibindo deformação e amarelecimento das fôlhas. O autor aventou a hipótese de que pudesse existir uma relação entre as doenças dessas plantas silvestres e a grave moléstia de algodão denominada "*Stenosis*" e que se caracteriza por sintomas semelhantes. Pressupôs BOTERO que um inseto fosse o vetor natural desta doença.

HOLMES (36, 1941), classificando e coligindo os conhecimentos até então conseguidos sôbre os virus em geral, dá como desconhecido o inseto vetor da "clorose infecciosa" das malváceas.

KUNKEL (50, 1943), em suas considerações gerais sôbre os virus de "*Abutilon mosaic*" e "*Aster Yellows*", repete o que BAUR concluira em 1904 e 1906 a respeito da doença em estudo, fazendo a seguinte pergunta: "Se de fato os agentes causais dessas doenças pertencem à classe dos virus, por que não podem eles ser transmitidos?" (Refere-se aqui à disseminação natural). Não conhecemos, continua KUNKEL, resposta a esta pergunta; são problemas ainda não resolvidos, da fitovirologia. Entretanto friza que os que estão familiarisados com as anomalias desse tipo, não duvidam que elas devem ter como causas agentes infeciosos do grupo dos virus.

Ainda podemos citar aqui os trabalhos gerais de SMITH (72, 1937), BRIERLEY (15, 1944), DARLINGTON (23, 1944), SMITH (73, 1945) e COOK (19, 1946), que também indicam que o virus em estudo não fôra até então transmitido por insetos.

GÄUMANN (30, 1945) refere-se à transmissão natural da "clorose infecciosa" de *Abutilon* por insetos nas Índias Ocidentais como a um fato comprovado, sem poder apoiar-se, no entanto, nesse particular, em quaisquer observações exatas.

Finalmente incluimos ainda, nessa revisão da literatura relativa à possivel transmissibilidade ou intransmissibilidade do virus da "clorose infecciosa" das malváceas, por insetos, nossa nota preliminar sôbre o assunto (58, 1945), onde mostramos, pela primeira vês, que de fáto êsse virus pode ser transmitido por insetos (aleirodídeos).

Em seguida a esta exposição nos referiremos, embora ligeiramente, às informações conseguidas na literatura relativas à propagação dos virus em geral por representantes da família *Aleyrodidae,* á qual também pertence o vetor da "clorose infecciosa" por nós determinado.

Relativamente muito poucas são as espécies de aleirodídeos que já foram relacionadas com a disseminação de virus, sendo também relativamente pequeno o número dos virus propagados por insetos pertencentes a tal família.

Os trabalhos mais antigos citam a espécie, *Trialeurodes vaporariorum* (WESTW.) (= *Asterochiton vaporariorum, Aleurodes vaporarium*) como vetor de *"tomato mosaic"* (12, 1922), *"potato mosaic"* (71, 1927) e *"Convallaria majalis mosaic"* (13, 1929).

A espécie *Bemisia tabaci* (GENN.) (= *B. gossypiperda* MISRA e LAMBA) a que pertence o vetor do *Abutilon virus* 1, por nós determinado, já fôra relacionada com a transmissão do virus do *"leaf-curl"* do algodoeiro (43, 1931). MATHUR (53, 1932), conseguiu também transmitir por esse aleirodídeo o virus do *"leaf-curl"* do algodoeiro para *Zinnia* spp. e em 1934 COWLAND (21), confirma a transmissibilidade desse virus por *B. gossypiperda.*

A propagação do virus do *"leaf-curl"* do fumo por êsse inseto foi verificada por STOREY (76, 1932) e HORNBY (38, 1933). Mais resultados positivos de transmissão desta mesma doença pelo mesmo vetor foram conseguidos na Índia por PRUTHI e SAMUEL (62, 1937) e mais tarde por PADWICK (59, 1939) (60, 1940). Em 1940 e 1942, MATSUMOTO (54) e PRUTHI e SAMUEL (63), respectivamente, já consideram definitivos esses conhecimentos, aproveitando-os para divulgação e em estudos gerais. PRUTHI (64, 1945), em um estudo mais especializado, consegue distinguir cinco diferentes tipos de *"leaf-curl"* do fumo, todos transmitidos por *B. gossypiperda.*

STOREY e NICHOLS (80, 1938) conseguiram provar que o mesmo inseto é também vetor do "mosáico da mandioca".

Na literatura há ainda referência à transmissão, por *B. gossypiperda*, de outros virus cuja classificação e propriedades são menos conhecidas.

Assim, UPPAL e colaboradores em 1940 (85), constatam a transmissão de "*Yellow mosaic*" de *Hibiscus esculentus* por êsse inseto, o mesmo acontecendo com o virus de "*pseudo-peh-sin*" ou "*falso mosáico*" do fumo e *Eupatorium odoratum* por VAN DER LAAN (86, 1939) (87, 1940).

Ainda encontramos indicação quanto á disseminação do "*Yellow vein mosaic*" de *H. esculentus* (3, 1942) (6, 1943) e do virus de "*rugose mosaic*" do tomateiro (3, 1942) por êsse mesmo aleirodídeo.

São também relacionadas com a transmissão de virus algumas outras espécies pertencentes a essa mesma família. Entre elas mencionamos aqui *Bemisia nigeriensis* CORBETT, como vetor do "mosáico da mandioca" (32, 1935) (33, 1936) (80, 1938) e *Trialeurodes natalensis* como transmitindo o virus de "*leaf-curl*" do fumo para plantas de fumo e outras solanáceas (55, 1940). STOREY e NICHOLS (80, 1938) referem-se ainda ao papel de *Bemisia gossypiperda* var. *mosaicivetura* (J. GHESQUIÈRE) na transmissão do "mosáico da mandioca", FRAPPA (29, 1938) dá uma descrição de *Bemisia manihotis* como eventual vetor do "mosáico da mandioca" na ilha de Madagascar.

Finalmente deve ser lembrado que muitas citações da literatura relativas a vetores de doenças de virus, da família dos aleirodídeos, não contêm a classificação exáta da espécie do inseto, limitando-se a denominações gerais, como a de "*Bemisia* sp." e de "aleirodídeos".

São citados como transmitidos por *Bemisia* sp. os virus de "*leaf-curl*" do fumo (76, 1932) (83, 1932) (78, 1935), "*Cassava mosaic*" (78, 1935) (79, 1937), "*tobacco pox*" (84, 1939) e "*brown streak*" da mandioca (81, 1939) (5, 1942).

Sob o nome geral de "aleirodídeos" (white-fly, aleyrodid, etc.) a literatura registra como propagados por êsses insetos os virus de: "*leaf-curl*" do algodoeiro (31, 1930) (41, 1930) (42, 1930), "*leaf-curl*" do geranium (9, 1938), "*leaf-curl*" do fumo (74, 1931) (37, 1932) (2, 1932) (57, 1933) e "*cassava mosaic*" (48, 1932) (77, 1934) (28, 1937) (68, 1938); esta última citação refere-se a uma informação dada por A. S. COSTA.

Outros virus, ainda citados como transmitidos por "aleirodídeos", são "*gloss disease*" das solanáceas (46, 1938), "*pseudo-peh-sin*" ou "falso mosáico" do fumo (86, 1939), "mosáico de *H. esculentus*" (10, 1942) e uma nova doença da batata dôce (34, 1944).

III — ESTUDOS PRELIMINARES PARA DETERMINAÇÃO DO PAPEL DOS INSETOS EM GERAL, NA DISSEMINAÇÃO DO VIRUS DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS

Neste capitulo passamos a descrever as experiências que realizamos com o fim de préviamente evidenciar a possibilidade de disseminação natural do virus da "clorose infecciosa" das malváceas e nos orientar a respeito da subclasse (*Pterygota* ou *Apterygota*) a que deveriam pertencer os insetos relacionados com a sua propagação.

As observações gerais resultantes dessas experiências preliminares, aliás confirmadas ao ser encontrado por nós um dos vetores do virus em questão, além de fortalecerem as bases para o início de um estudo dessa natureza, vieram restringir sensivelmente o número dos insetos escolhidos para os testes de transmissão propriamente ditos.

É verdade, entretanto, que as observações conseguidas por essas experiências não excluiam inteiramente a possibilidade de disseminação do virus em estudo por agentes vetores outros que não insetos, principalmente os ácaros.

Devido, porém à quase exclusividade, com que a propagação das doenças de virus está relacionada com os insetos, nunca consideramos agentes que não pertencem aos insetos como prováveis vetores do virus em estudo, não obstante havermos incluido inicialmente em nossos ensáios de transmissão uma espécie pertencente á ordem *Acari*.

A — EXPERIÊNCIA REALIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE TRANSMISSÃO DO VIRUS EM ESTUDO, POR INSETOS EM GERAL.

Ao iniciarmos em 1/6/1943, os ensáios referentes a êste trabalho, procuramos coletar no local do estudo (Campo Experimental de Ibirapuéra — Instituto Biológico) as espécies de insetos que pela sua maior frequência foram inicialmente consideradas por nós como prováveis vetores do virus em questão.

Nesse local, entretanto, existe, em forma espontânea, além de uma numerosa vegetação de uma malvácea da espécie *Sida rhombifolia* L., que aparece abundantemente atacada pelo *Abutilon virus* 1. (69, 1943) e por êsse motivo se tornou alvo principal de nossos estudos, um número relativamente grande de outras espécies vegetais.

Constatamos, desde logo, sôbre o conjunto dessas plantas selvagens, uma população intensa de insetos pertencentes às mais variadas espécies ou famílias, o que dificultava enormemente a coleta dos prováveis insetos vetores da doença em estudo, que naturalmente deve-

riam também alí estar presentes, e provavelmente pertencer ao grupo dos insetos sugadores.

Com o fim, pois, de facilitar o trabalho, foi montado um pequeno campo cultural constituido exclusivamente de plantas sadías e doentes da espécie *Sida rhombifolia,* que como se sabe, é bastante sensivel à infecção por êsse virus, e muito comumente espalhada em nosso Estado (69, 1943).

Êsse campo, montado conforme fig. 1, além de servir aos fins já referidos, forneceu-nos concomitantemente as primeiras informações seguras quanto á transmissibilidade do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por insetos em geral, conclusão que permitiu intensificar ainda mais a catação desses agentes vetores, assim, portanto, experimentalmente evidenciados. Este último objetivo foi aqui alcançado por ter sido construido o referido campo nos seguintes moldes:

Para a montagem desse ensáio partimos, de determinados lotes de sementes, oriundos de plantas da espécie *Sida rhombifolia,* sadías ou doentes.

As sementes provindas de plantas sadías como as de plantas doentes, foram, em 1/10/43, semeadas separadamente em caixas, mantidas em estufa à prova de insetos, para germinação.

Em 18-19/11/43, parte das plantas daí resultantes foi transplantada no campo, conforme fig. 1, e parte conservada ainda na estufa e protegida da ação dos insetos.

O número total de plantas aproveitáveis, oriundas de sementes de plantas sadías, que foram levadas ao campo e que permaneceram em estufa sob proteção, foi respectivamente de 537 e 320. Os números correspondentes, das plantas oriundas de sementes de plantas doentes, foram respectivamente 559 e 115.

As plantas sadías da espécie *S. rhombifolia,* oriundas de sementes de plantas sadías ou doentes, transportadas para o campo, foram aí distribuidas em linhas alternadas, de 60 a 74 plantas.

Com o fim de provocar maior incidência da doença, foram ainda distribuidas 10 plantas doentes da espécie *S. rhombifolia* entre as linhas dos lotes E e F, ou 25 em cada uma das cabeceiras dos lotes A e B (fig. 1).

Essa cultura foi mantida no limpo por meio de capinas, e isolada, em todos os lados, por uma faixa de terreno de 3 metros sem vegetação.

As observações se prolongaram, quanto ás plantas sadías transplantadas no campo, até 16/3/44, e ás da estufa até 28/3/44, quando foram eliminadas.

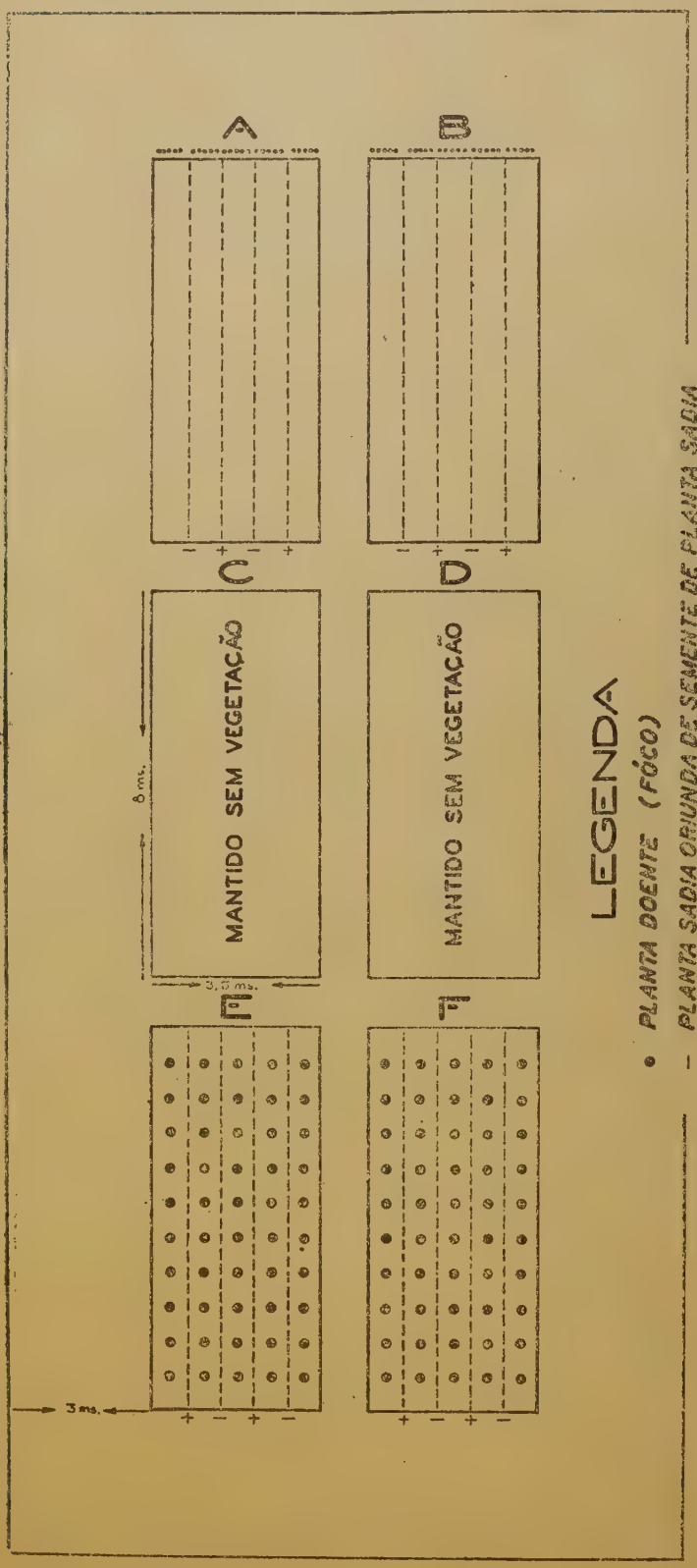


Fig. 1 — Representação esquemática do campo experimental montado para comprovação da possibilidade de disseminação do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por insetos em geral. (Campo Experimental Ibirapuéra — Instituto Biológico).

A totalidade das plantas sadías, oriundas das sementes de plantas sadías ou doentes e mantidas em estufa, até a data da eliminação, não demonstrou qualquer indício de doença, o que confirmou as observações de SILBERSCHMIDT (69-70, 1943, 1945) relativas à não transmissibilidade, pelo menos no gênero *Sida*, da "clorose infecciosa" pelas sementes. Entre as plantas, porem, que haviam sido transportadas para o campo, encontramos em 30/12/43 já um número de 12 (5 oriundas de sementes de plantas doentes e 7 de sementes de plantas sadías) tipicamente doentes.

As plantas sadías do campo foram-se infectando dessa maneira, progressivamente, pelo virus da "clorose infecciosa" das malváceas. Assim é que, na data da última observação (16/3/44), sómente 86 plantas das 1096 expostas, ou 7, 87% não apresentavam indício da doença; isto é, das 537 plantas sadías oriundas de sementes de plantas sadías, 491 se mostravam com sintomas típicos da doença, sendo essa relação de 559:519, para as plantas originadas de sementes de plantas doentes.

Êsses resultados, associados aos conhecimentos já existentes quanto aos meios de propagação desse virus, revelaram-nos a existência de um agente intermediário natural (com toda a probabilidade um inseto) que deveria transferir o agente causal da "clorose infecciosa" das malváceas, das plantas doentes para as sadías, conclusão que permitiu intensificar a procura de um vetor, agora então de existência quase comprovada.

Queremos aqui frizar que, de acôrdo com os resultados colhidos nessa experiência preliminar, não nos foi possivel observar transmissão do virus em estudo pela semente, nem aparentemente ficou demonstrada a existência de uma eventual maior suscetibilidade das plantas sadías originadas das sementes de plantas doentes em relação às provindas das sementes de plantas sadías.

B — EXPERIÊNCIA REALIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA SUBCLASSE (*PTERYGOTA* OU *APTERYGOTA*), A QUE DEVERIAM PERTENCER OS INSETOS RELACIONADOS COM A DISSEMINAÇÃO DO VIRUS EM ESTUDO.

Em 18/1/45, quando as experiências de transmissão propriamente ditas, já em andamento, continuavam a fornecer sómente resultados negativos, procuramos ainda determinar a subclasse (se alado ou aptero) dos insetos, que pela experiência A desse paragrafo, já haviam sido, de modo geral, relacionados com a disseminação natural do virus da "clorose infecciosa" das malváceas. Julgamos que uma determinação nesse sentido viria diminuir a amplitude de nossas experiências,

por restringir o número dos insetos que deveriam ser submetidos aos testes de transmissão propriamente ditos.

Para essa determinação utilizamo-nos de dois conjuntos com semelhança de ilha, e cuja representação (fig. 2), é por sí evidente.

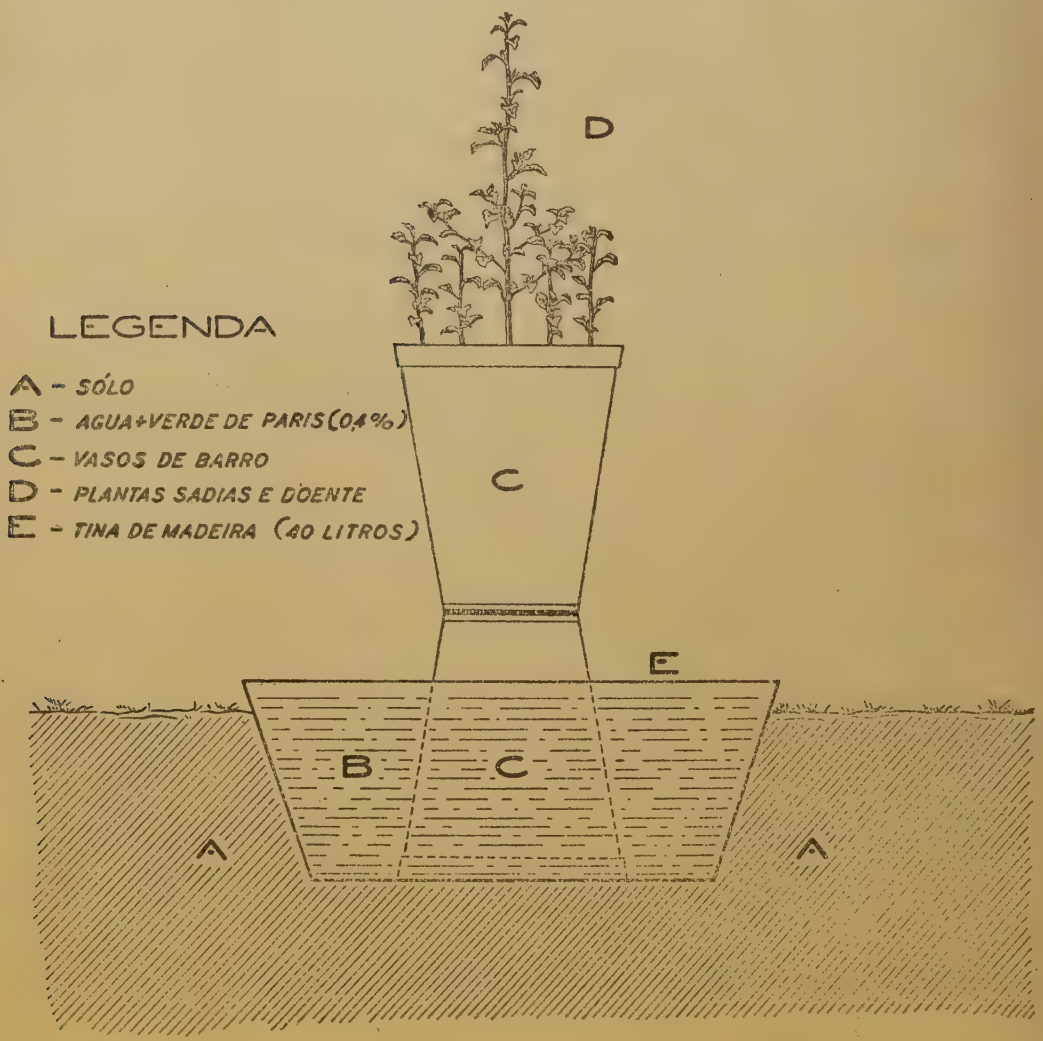


Fig. 2 — Representação esquemática de um dos conjuntos utilizados para determinação da subclasse *(Pterygota* ou *Apterygota)*, a que deveriam pertencer os insetos relacionados com a disseminação do virus da "clorose infecciosa" das malváceas.

Em um desses conjuntos, além das plantas de *Sida rhombifolia* sadías, em número de 11, foi ainda incluida uma planta fóco da mesma espécie e que apresentava os sintomas típicos da "clorose infecciosa".

Todas as plantas, doentes e sadías, utilizadas, foram cultivadas em estufa, préviamente fumigadas com sulfato de nicotina (3/1/1945

e 12/1/1945), enxofradas (4/1/1945 e 13/1/1945) e plantadas em vasos contendo terra esterilizada.

Em 18/1/1945 êsses conjuntos foram transportados para o campo, a-fim-de se colherem as observações desejadas.

Depois de decorrido mais ou menos um mês da colocação dessas "ilhas" no campo, isto é, em 23/2/1945, já foi notada em uma das plantas sadías do conjunto que não recebera planta fóco, a doença em estado inicial. Em 27/2/1945, nessa mesma "ilha", foi constatado o segundo caso de transmissão.

Em 6/6/1945 foi ainda observado, no conjunto que continha uma planta doente servindo como fóco, o primeiro caso de doença entre as plantas de *Sida rhombifolia* sadías.

Esta experiência, que foi encerrada em 28/6/1945, indicou-nos dessa maneira que o inseto ou insetos responsáveis pela disseminação do virus da "clorose infecciosa" das malváceas, em nossas condições, deveriam ser alados, isto é, pertencer à subclasse *Pterygota*, uma vês que conseguiram atingir as palntas sadías, que foram mantidas convenientemente isoladas do sólo.

Êsses resultados, que foram mais tarde confirmados por havermos encontrado como transmissor do virus em estudo o aleirodídeo *Bemisia tabaci* (GENN.), indicaram-nos, na ocasião do ensáio, que a coleta dos prováveis vetores poderia continuar a ser realizada, sómente visando os insetos de forma alada, excluindo dessa maneira as espécies apteras, que aliás são abundantes e principalmente avistadas no sólo.

Essa experiência, por outro lado, também confirmou a nossa suposição já referida, de que espécies de ácaros não deveriam estar relacionadas com a disseminação do virus em estudo.

IV — EXPERIÊNCIAS DE TRANSMISSÃO DO VIRUS DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS, POR INSETOS

Após a descrição sumária dos principais conhecimentos preliminares que conseguimos determinar quanto à disseminação natural do virus da "clorose infecciosa" das malváceas, procuramos nos três itens de que se compõe êste parágrafo, expor os resultados que obtivemos nos ensáios sôbre a transmissão propriamente dita desse virus, por insetos.

TABELA 1

Resumo das experiências de transmissão do virus da "Clorose Infecciosa" das malváceas, que forneceram resultados negativos, e citação das respectivas espécies de insetos e ácaro, testadas

Ordem	Família	Espécie de insetos testados	N.º total de insetos testados	Modalidade dos testes de transmissão			
				1	2	3	4
				N.º de matrizes testadas			
HOMOPTERA	*Aphididae*	1 — *Myzus persicae* Sulz.	1.660	11	21	2	1
		2 — *Aphis gossypii* Glover	3.812	22	103	3	2
	CICADELLIDAE	3 — *Protalebra brasiliensis* Baker..	1.116	24	29	2	3
		4 — *Parallaxis vacillans* McAtee ..	773	17	32	2	3
		5* — *Empoasca sativae* Poos.	600	15	37	1	1
		6 — *Agallia albidula* Uhler	915	22	31	2	2
		7* — *Xerophloea viridis* (F.)	291	8	6	1	1
		8* — *Scaphytopius*, prov. *marginelineatus* (Stal)	185	5	7	1	1
		9 — *Entogonia sagata* Sign.	177	5	6	1	1
		10 — *Pleisommata molicella* (Fowl.)	163	6	4	1	—
		11 — *Osbornellus mexicanus* (Osb.)	62	2	—	—	1
		12 — *Cicadella leucomellas* (Walker)	155	6	—	1	1
		13 — *Agalliopsis novella vicosa* (Oman)	73	3	—	—	1
		14 — *Agalliana sticticollis* (Stal)..	82	5	—	—	1
		15 — *Agalliana* sp.	21	2	—	—	1
Hemiptera	*Tingidae*	16 — *Corythaica monacha* (Stal)...	320	8	12	2	1
	Anthocoridae	17 — *Orius insidiosus* (Say)	73	5	—	—	1
	Miridae	18 — *Halticus spegazzinii* (Berg) .	295	13	5	1	1
Thysanoptera	*Thripidae*	19 — *Sericothrips sidae* Craw.	371	6	21	1	1
		20 — *Thrips tabaci* Lind.	257	3	15	1	1

Ordem	Família	Espécie de ácaro testado	N.º total de ácaros testados	Modalidade dos testes de transmissão			
				1	2	3	4
				N.º de matrizes testadas			
Acari	*Tetranychidae*	21 — *Tetranychus telarius* (L.) ...	315	—	11	2	—

* Cicadelídeos que demonstraram ter ação toxicogênica.

A — RESULTADOS NEGATIVOS DE TRANSMISSÃO OBTIDOS COM O EMPREGO DE OUTROS INSETOS, QUE NÃO O ALEIRODÍDEO-VETOR *BEMISIA TABACI* (GENN.)

Procuramos resumir neste item, sómente os resultados negativos de transmissão, obtidos com o emprego de outros insetos que não o aleirodídeo determinado como vetor (Parágrafo IV — B e C); dados que foram colhidos em experiências realizadas a partir de 1/6/1943 a 25/4/1945, e em cujas experiências foram testadas 20 diferentes espécies de insetos de diversas ordens e famílias, todas comumente encontradas no campo sôbre *Sida rhombifolia*, sadías ou doentes.

Entre êsse resultados negativos de transmissão, ainda incluimos os que foram obtidos em experiências relativas a uma espécie de ácaro (*Tetranychus telarius* L.), que também foi encontrada sôbre *Sida rhombifolia* no campo, mas principalmente nos ambientes de estufa e ripado, e cujos testes de transmissão, pouco numerosos, foram realizados anteriormente à experiência citada no parágrafo III, item B.

Os primeiros resultados experimentais, relativos às 20 espécies de insetos e à espécie de ácaro, embora negativos, são aqui descritos porque achamos serem eles suficientemente fundamentados para nos oferecerem uma evidência, bastante sugestiva, de que as espécies de insetos por nós examinadas e pertencentes à outras famílias, que não *Aleyrodidae*, não são responsáveis pela transmissão do virus em estudo.

As experiências que nos forneceram os resultados negativos de transmissão se encontram sumariamente registradas na tabela 1, onde também são citadas todas as espécies de insetos e ácaro testadas, e que demonstraram em nossos ensáios falta de eficiência na disseminação do virus da "clorose infecciosa" das malváceas.

Queremos ainda frizar que todas as espécies referidas na tabela 1 foram testadas para se conseguir maior segurança, sob diversas modalidades de ensáios de transmissão.

As modalidades dos testes de transmissão designados na tabela 1, sob os números 1, 2, 3 e 4 e para os quais sempre foram utilizadas plantas da espécie *Sida rhombifolia*, ainda muito novas, obedeceram em linhas gerais às seguintes caracteristicas:

Modalidade — 1 — Insetos coletados no campo, preferivelmente sôbre plantas doentes, e transferidos diretamente para plantas sadías cultivadas em estufa e protegidas individualmente após a infestação, por mangas de vidro.

Número de inseto por matriz: 5 a 15.

Período de observação mínimo: 2 mêses.

Modalidade — 2 — Insetos criados em plantas sadías, alimentados em plantas doentes (3 a 10 dias) e transferidos posteriormente para as plantas sadías experimentais, conforme modalidade 1.

Modalidade — 3 — Insetos coletados no campo ou criados em estufa, transferidos para viveiros protegidos por téla metálica e vidro, ou só por pano, e que continham uma ou mais plantas doentes (Fócos), rodeadas por plantas sadías em número variavel. Êsses conjuntos, antes e depois de infestados, permaneceram em estufas de téla ou vidro.

Número de insetos por matriz: 30 - 40.

Período de observação mínimo: 3 mêses.

Modalidade — 4 — Insetos infestando plantas sadías e doentes, protegidas em conjunto por viveiros colocados no campo e com técnica semelhante à modalidade 3.

Dessa maneira julgamos poder concluir, devido a êsses numerosos e distintos testes, de resultados negativos, a que foram submetidos essas 20 diferentes espécies de insetos e a espécie de ácaro, em nossos ensáios de transmissão, que de fato o virus da "clorose infecciosa" das malváceas não deve ter relação, para sua disseminação, com nenhum dos agentes referidos na tabela 1.

B — RESULTADOS POSITIVOS DE TRANSMISSÃO CONSEGUIDOS COM A UTILIZAÇÃO DO ALEIRODÍDEO *BEMISIA TABACI* (GENN.)

As experiências relativas ao estudo de transmissão do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por insetos, apezar dos numerosos resultados negativos conseguidos e já descritos, estavam ainda em andamento, quando em 25/4/1945 notamos em um dos viveiros colocados no campo, ainda não infestado e que continha duas plantas de *Sida rhombifolia* doentes e 25 plantas sadías da mesma espécie, oito diferentes casos de transmissão do virus em estudo. Nesse ambiente constatamos, por um exame detalhado, uma invasão de insetos pertencentes à família *Aleyrodidae* (moscas brancas), com predominância da espécie que mais tarde foi determinada como *Bemisia tabaci* (GENN.).

Dessa maneira essa observação foi tomada por base para a realização das experiências de transmissão do virus em estudo por àquele aleirodídeo, cujos resultados em parte são referidos neste item.

Queremos ainda frizar que aleirodídeos da espécie *Bemisia tabaci* foram também mais tarde frequentemente constatados no campo, sendo em nossas experiências empregados, em maior número, indivíduos dessa origem.

Passamos agora a descrever os detalhes essenciais da têcnica utilizada nesses estudos de transmissão:

Os aleirodídeos utilizados nessas experiências, que como já foi dito pertencem à espécie *Bemisia tabaci*, foram criados diretamente em plantas doentes da espécie *Sida rhombifolia* e a partir de indivíduos oriundos do campo ou do viveiro onde foram pela primeira vês constatados. Sómente os adultos assim resultantes das primeiras ou segundas gerações é que foram transferidos para as

plantas sadías, individualmente protegidas por mangas de vidro ou plantadas em conjunto com plantas doentes, em caixas à prova de insetos.

Foram utilizadas como plantas sadías as malváceas das espécies, *Sida rhombifolia* e *Abutilon striatum* var. *spurium*.

Dessa maneira, em nossos ensáios, as transmissões pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* foram obtidas a partir de *Sida rhombifolia* doentes, para plantas sadías da mesma espécie e da espécie *Abutilon striatum* var. *spurium*.

Todas as experiências foram sempre controladas por plantas testemunhas da mesma origem que as infestadas e mantidas isentas de insetos, em estufas ou em caixas protegidas com pano e vidro.

No final dessas experiências já possuiamos também nove plantas sadías da espécie *Sida rhombifolia*, sôbre as quais conseguimos criar, em número elevado, espécimens de *Bemisia tabaci* garantidamente sadíos, e onde não notamos qualquer ação toxigênica provocada por êsses insetos. (Ver pag. 20-21).

Os resultados de transmissão do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por *Bemisia tabaci* e a partir de plantas de *Sida rhombifolia* doentes, por nós conseguidos, acham-se reunidos pormenorisadamente nas tabelas 2 e 3. A tabela 2, indica os resultados de transmissão colhidos pela transferência direta dos aleirodídeos criados em plantas doentes, para as plantas sadías individualmente protegidas por mangas de vidro. Na tabela 3, estão registrados os resultados de transmissão obtidos pela transferência dos aleirodídeos para os conjuntos contendo plantas doentes ao lado de sadías.

TABELA 2

Resultados de transmissão do virus da "Clorose Infecciosa" das malváceas pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* (GENN.), conseguidos pela transferência dos insetos presumivelmente infectivos para plantas sadias e individualmente protegidas por mangas de vidro

Espécie das plantas utilizadas como fonte	Espécie das plantas sadias testadas	Número de plantas sadias testadas	Número de aleirodídeo por planta	Número de plantas tornadas doentes	Porcentagem de transmissão	Número de plantas testemunhas	Número de plantas testemunhas tornadas doentes
Sida rhombifolia L.	*Sida rhombifolia*	29	30	29	100,00	30	0
	Abutilon striatum var. *spurium*	25	30-50	18	72,00	20	0

Verificamos assim, por um exame da tabela 2, que o aleirodídeo *Bemisia tabaci*, quando criado em plantas doentes e transferido diretamente para plantas sadías, em número aí expresso, consegue transmitir o virus em estudo em porcentagens elevadas, quer para plantas da espécie *Sida rhombifolia*, (100%), quer para plantas da espécie *Abutilon striatum* var. *spurium*, (72%).

TABELA 3

Resultados de transmissão do virus da "Clorose Infecciosa" das malváceas pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* (GENN.), obtidos pela infestação de conjuntos contendo plantas sadías e doentes

Espécie das plantas utilizadas como fonte	Espécie das plantas sadias testadas	Número de matrizes testadas	Número de aleirodídeo por matriz	Número de matrizes com plantas tornadas doentes	Total das plantas sadias testadas	Total das plantas que adoeceram	Porcentagem de transmissão	Número de matrizes testemunhas	Número de matrizes testemunhas com plantas tornadas doentes	Duração média de cada experiência, em dias
Sida rhombifolia L.	*Sida rhombifolia*	5	50-60	5	44	30	68,18	4	0	73,60
	Abutilon striatum var. *spurium*	4	60-80	4	27	22	81,48	4	0	126,00

Por outro lado, os resultados registrados na tabela 3, obtidos por outra modalidade de ensáio, isto é, por infestação de conjuntos contendo plantas sadías ao lado de doentes, confirmam os expressos na tabela 2, fornecendo-nos ainda uma nova evidência da transmissibilidade do virus em questão pelo aleirodídeo *B. tabaci*, sendo aqui registradas porcentagens de transmissão de 68,18 e 81,48, respectivamente para as plantas das espécies *Sida rhombifolia* e *Abutilon striatum* var. *spurium*.

As tabelas 2 e 3, ainda mostram que as plantas de ambas as espécies, reservadas como testemunhas, ao contrário das infestadas, em todos os ensáios, sempre se mantiveram sadías.

Concluindo, julgamos portanto que êsses resultados positivos de transmissão, conseguidos por duas diferentes modalidades de experiências e em um número relativamente grande de repetições, indicam, de modo significante, que o virus da "clorose infecciosa" das malvá-

ceas, de fato tem, para sua disseminação, relação com a aleirodídeo *Bemisia tabaci* (GENN.).

Nessas nossas experiências de transmissão, pudemos observar, ainda, que em plantas da espécie *Sida rhombifolia* os primeiros sintomas da doença aparecem de 5 a 28 dias após a infestação das plantas sadías pelos aleirodídeos, tendo sido registrado para as plantas da espécie *Abutilon striatum* var. *spurium* o tempo mínimo de 12 e máximo de 45 dias.

C — RESULTADOS COMPLEMENTARES OBTIDOS COM O EMPREGO DE *BEMISIA TABACI* (GENN.) E RELATIVOS AO NÚMERO MÍNIMO DE INDIVÍDUOS NECESSÁRIO PARA A TRANSMISSÃO DO VIRUS EM ESTUDO

Com o fim de tornar ainda mais evidente a transmissibilidade do virus da "clorose infecciosa" das malváceas pelo aleirodídeo *B. tabaci*, e conseguir dados mais precisos do que os já existentes na literatura quanto á transmissão de virus em geral por um único indivíduo de inseto pertencente à família *Aleyrodidae*, é que resolvemos desenvolver as esperiências que neste item vamos referir.

Na questão do número de aleirodídeos necessário para obtenção de transmissão dos virus em geral, encontramos na literatura citações de experiências efetuadas, com exceção de uma, com um número relativamente grande de indivíduos.

Assim, KIRKPATRICK (42, 1930), em seus ensáios de transmissão do virus do "*leaf-curl*" do algodoeiro por "aleirodídeo", usou de 50 a 200 indivíduos, para obter resultados positivos de transmissão.

"Um grande número" de indivíduos do aleirodídeo *Bemisia gossypiperda* MISRA e LAMBA, foi também utilisado nos ensáios de transmissão de COWLAND (21, 1934) relativos ao mesmo virus do "*leaf-curl*" do algodoeiro.

STOREY (78, 1935) e WEST (88, 1936), relativamente ao virus do "*leaf-curl*" do fumo, só o conseguiram transmitir, usando grande número de adultos de *Bemisia* sp., que WEST (88, 1936) especificou como abrangendo de 25 a 50 adultos.

PRUTHI e SAMUEL (62, 1937), observaram ainda a propagação desse mesmo virus, empregando de 3 a 6 adultos de *B. gossypiperda*.

Relativamente ao virus do "mosáico da mandioca", que é também transmitido por aleirodídeo, STOREY e NICHOLS (80, 1938) o conseguiram transmitir usando de 50 a 100 indivíduos de *B. gossypiperda* por planta sadía.

HOLMES (36, 1939) e LEACH (51, 1940) ainda, ao se referirem, respectivamente, aos virus de "*leaf-curl*" do fumo e "mosáico da man-

dioca", que são propagados pelo mesmo vetor, *B. gossypiperda*, referem que êsses virus sómente já foram transmitidos pelo emprego de grande número de indivíduos desse inseto.

A única referência que encontramos á transmissibilidade de um virus por um único indivíduo de inseto pertencente à família *Aleyrodidae*, foi a de KIRKPATRICK (43, 1931), relativa à *Bemisia gossypiperda* e à doença do algodoeiro conhecida por *"leaf-curl"*.

Vemos, assim, que em todas essas experiências de transmissão de virus em geral por aleirodídeos, nas quais pudemos encontrar referência especificada ao número de insetos empregados, foi sempre utilisado, com exceção de um caso (43, 1931), um número relativamente grande de indivíduos.

Portanto a questão da transmissibilidade de um virus por um único indivíduo de inseto, que aliás já é bem assentada para os afídeos e cicadelídeos, necessita a nosso vêr, quanto aos aleirodídeos, de confirmação mais abundante.

Por essa razão procuramos, em nossas experiências de transmissão do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por *B. tabaci*, obter mais uma evidência da possivel transmissibilidade de um virus por um único indivíduo de vetor pertencente à família *Aleyrodidae*.

Tais experiências, além disso, como já frizamos, seriam valiosas por confirmarem mais uma vês e de maneira muito sugestiva, a transmissibilidade do virus em estudo, por *Bemisia tabaci*.

A técnica que empregamos para a execução desse ensáio foi semelhante á já descrita no item B deste capitulo.

Os insetos foram criados em plantas da espécie *Sida rhombifolia*, que apresentavam sintomas típicos da doença em estudo.

Depois de uma ou duas gerações, os adultos daí resultantes foram transferidos para plantas sadías da mesma espécie e ainda muito novas e em número controlado. As plantas sadías, protegidas após a infestação por pequenos tubos de vidro de 3-4 cm de diametro e de 10 cm de altura, foram mantidas em observação por dois mêses.

Foram também reservadas 38 plantas sadías da mesma origem das infestadas, como testemunhas e mantidas na estufa.

Oito dessas plantas receberam ainda, em 5/10/1945, de 20 a 30 aleirodídeos que estavam sendo criados em uma planta sadía e foram tratados de modo semelhante às infestadas com os insetos oriundos de plantas doentes. O total dos aleirodídeos oriundos dessas 9 plantas sadías serviu para controlar uma possivel existência de uma ação toxicogênica desses insetos, o que aliás nunca se mostrou evidentemente em nossas experiências.

Os resultados colhidos nesse ensáio, que se prolongou de 19/6/1945 a 9/11/1945, estão condensados na tabela 4.

TABELA 4

Resultados conseguidos com o emprego de *Bemisia tabaci* (GENN.) e relacionados ao número mínimo de insetos necessários para transmissão do virus da "Clorose Infecciosa" das malváceas

Número de insetos por planta	Sexo	Número de plantas testadas	Número de plantas tornadas doentes	Porcentagem de transmissão	Número de plantas testemunhas isentas de insetos	Número de plantas tornadas doentes	Número de plantas testemunhas com insetos sadios	Número de plantas doentes
1	♀	23	10	43,48	30	0	9	0
1	♂	20	4	20,00	—	—	—	—
5	♂ + ♀	17	14	82,35	—	—	—	—
10	♂ + ♀	17	17	100,00	—	—	—	—

Essa tabela mostra que de fato o aleirodídeo *Bemisia tabaci* deve ser considerado, com muita segurança, como vetor do virus da "clorose infecciosa" das malváceas, o que vem confirmar as observações conseguidas no item B deste capítulo.

Por outro lado, os resultados expressos na tabela 4 indicam também que, empregando-se um único exemplar de *B. tabaci* seja macho ou fêmea, consegue-se obter transmissão do virus em estudo. A eficiência, porém, prova ser acentuadamente maior quando são utilizados indivíduos fêmeas.

Verificamos, ainda, que as porcentagens de transmissão crescem progressivamente com o aumento do número de insetos presumivelmente infectivos transferidos para as plantas sadías, observando-se já, com o emprego apenas de 10 indivíduos por planta sadía, 100% de casos positivos.

Dessa maneira, êsses novos resultados, além de fornecer indicações positivas quanto à transmissibilidade do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por *Bemisia tabaci* (GENN.), confirmam nitidamente, para o virus em questão, a observação de KIRKPATRICK (43, 1931), quanto á possibilidade de transmissão de um virus (*"leaf-curl"* do algodoeiro) por um único exemplar de inseto pertencente à família *Aleyrodidae.*

V — DISCUSSÃO

Neste capítulo, reservado à discussão das observações e resultados colhidos no decorrer dos nossos estudos da transmissão do virus da "clorose infecciosa" das malváceas (*Abutilon virus* 1.) por inseto,

queremos destacar sumariamente apenas alguns pontos que consideramos ainda não suficientemente evidenciados neste trabalho.

Naturalmente uma discussão comparativa dos resultados a que chegamos, ainda mesmo dos negativos, não poderá ser aqui realizada, porque, como já frizamos no parágrafo II deste trabalho, não encontramos em toda a literatura consultada nenhuma referência a experiências diretas de transmissão do virus em estudo por insetos em geral.

Entretanto, seja-nos permitido referir aqui algumas considerações de ordem geral que surgiram em consequência dos resultados já expostos.

Assim, queremos ressaltar mais uma vês a suposição bem fundamentada de DAVIS (24, 1929), mais tarde também compartilhada entre outros por KÖHLER (45, 1932), KEUR (40, 1934), e BOTERO (14, 1940), da possibilidade da existência de um inseto, que poderia, nas regiões tropicais, onde muitas malváceas são indigenas, ter relação com a disseminação do virus em estudo. Neste particular merecem também destaque as ligeiras observações colhidas por COOK (18, 1931) em Porto Rico, que o levaram a concluir que o virus da "clorose infecciosa" das malváceas é propagado na natureza e possivelmente por insetos.

Atualmente, portanto, de acôrdo com os resultados positivos a que chegamos, da transmissão do virus em estudo, por *B. tabaci,* essas hipóteses e observações gerais, registradas pela literatura, obtiveram uma confirmação experimental inteiramente concorde com a idéia que encerram.

Êsses resultados, por outro lado, vêm também contribuir para tornar um pouco mais esclarecida a natureza do agente causal da "clorose infecciosa" das malváceas, que não obstante ser unanimemente aceita como virus, foi até a época atual sujeita a criteriosas dúvidas, devido principalmente á ausência de dados precisos e seguros que comprovassem também a possibilidade de existência de um meio natural de expansão dessa doença.

De ora em diante, porem, os dados precisos que resultaram das nossas observações, poderão eficientemente contribuir para dissipar de uma vês as idéias especulativas quanto á origem espontânea e não parasitária do virus da "clorose infecciosa", idéias que se basearam infalivelmente na suposta falta de uma disseminação natural desta doença. Encontramos essas idéias expostas, pela primeira vês, no trabalho clássico de BAUR (7, 1904) que não considera o agente causador da "clorose infecciosa" um parasita, mas vê nele um produto do

metabolismo da planta doente, dotado de qualidades autocatalíticas. De acôrdo com o apanhado de KÖHLER (45, 1932), a falta de dados quanto á disseminação natural da "clorose infecciosa" deu margem, mais tarde, à elaboração de verdadeiras teorias da "geração espontânea" do virus desta doença. MORITZ, na edição alemã do livro de KRENKE (47, 1933) aventa a hipótese de que por "fotosensibilização" a doença em questão pudesse ser provocada em certas malváceas. KUNKEL (50, 1943) refere-se também às hipóteses relativas à origem espontânea do virus da "clorose infecciosa", frizando a necessidade de esclarecer o problema da disseminação natural desta doença. A falta de dados exatos quanto á maneira de propagação natural da "clorose infecciosa" induziu, pelo menos de maneira indireta, bem recentemente, WOODS e DU BUY (89-90, 1943) a formular uma teoria da derivação dos virus vegetais dos plastídios das plantas hospedeiras (1). E, finalmente, ainda na suposição da exclusiva transmissibilidade do virus da "clorose infecciosa" pelo processo de enxertia, é que foi grandemente baseada a teoria de DARLINGTON (23, 1944), que admite uma influência decisiva da enxertia na própria geração do virus. Com a descoberta de um vetor natural da "clorose infecciosa" os defensores de todas essas teorias, na sua maioria um tanto especulativas, perderam seu principal ponto de apoio.

Mas da averiguação de um inseto da "clorose infecciosa" das malváceas não se podem apenas tirar conclusões de ordem teórica; ela dá também margem a considerações essencialmente práticas. Em primeiro lugar, a questão da eventual importância econômica da "clorose infecciosa" deve ser encarada por um novo ângulo. Já que sabemos, agora, que essa doença é transmitida, em condições naturais, por *Bemisia tabaci*, vetor de sérias doenças de virus do fumo, do algodão, da mandioca e de outras plantas cultivadas, nossa atenção há de dirigir-se à possivel ameaça que a presença de malváceas silvestres, atacadas pela "clorose infecciosa", dentro de culturas de plantas econômicas, pode representar para estas.

A possibilidade da existência de uma tal relação entre a frequência da "clorose infecciosa" e a incidência de sérias doenças de plantas cultivadas já tinha sido suspeitada por vários autores. Referindo-nos, em primeiro lugar, à doença *"leaf-curl"* do fumo, não podemos deixar de mencionar que já HORNBY (38, 1933) inclue uma malvácea, *Althaea rosea*, entre as plantas consideradas hospedeiras do virus da doença *"leaf-curl"* do fumo, e afirma ter verificado a

(1) Idéias semelhantes sobre uma eventual origem expontânea do virus — embora não estreitamente relacionadas com doenças do tipo da "Clorose Infecciosa" — foram ainda formuladas por BLODGETT (*Phytopath.* 34: 650-654, 1944) e JOHNSON (*J. Agric. Res.* 64: 443-454, 1942).

transmissão desta doença pelo vetor *Bemisia gossypiperda* para esta e outras plantas hospedeiras. STOREY (78, 1935) observou em *Sida* sp., certos sintomas semelhantes aos da doença *"leaf-curl"* do fumo. Também PAL e TANDEN (61, 1937), baseando-se em observações realizadas na Índia, chamam a atenção para o fato de exibirem plantas de *Althaea rosea* e de *Hibiscus rosa-sinensis*, frequentemente, sintomas semelhantes aos de pés de fumo atacados por *"leaf-curl"*. SHEPHERD (67, 1938), efetuando estudos na Costa de Ouro, considera os sintomas apresentados por *Malvastrum tricuspidatum* e *Sida carpinifolia* característicos da doença *"leaf-curl"* do fumo, e recomenda a erradicação das malváceas selvagens da visinhança dos viveiros do fumo. DEIGHTON (25, 1938), trabalhando em Sierra Leone, designa diretamente as espécies *Sida carpinifolia, Sida cordifolia* e *Sida veronicaefolia* como hospedeiras da doença *"leaf-curl"* do fumo.

Já que uma doença do fumo semelhante à *"leaf-curl"* foi observada também em nosso Estado, por COSTA e FORSTER (20, 1939), o problema das eventuais relações existentes entre esta doença e a "clorose infecciosa" adquire também aqui uma certa importância. Devemos, porem, frizar que não temos elementos para afirmar que os sintomas observados pelos vários autores em malváceas silvestres e relacionados com a doença *"leaf-curl"* do fumo, sejam idênticos aos da "clorose infecciosa".

Passando agora a avaliar o possivel perigo que a "clorose infecciosa" venha a constituir para outras culturas, é bem compreensivel que se pense principalmente no algodoeiro, planta pertencente à mesma família das Malváceas, na qual estão também incluidas as hospedeiras da "clorose infecciosa".

A possibilidade da existência de uma relação entre a ocorrência da "clorose infecciosa" de malváceas silvestres e a do *"leaf-curl"* ou de outras doenças de virus do algodoeiro já foi lembrada por vários autores. JOSUÉ DESLANDES, em carta que nos dirigiu de Alagoinha, no Estado da Paraíba, em fins de 1938, informou que o mosáico em algodoeiros americanos lhe pareceu mais frequente onde havia mais ocorrência de mudas nativas de "relógio" (*Sida* sp.). O material de *Sida* sp., que ele ao mesmo tempo gentilmente nos remeteu, exibia, nas fôlhas, sintomas típicos de "clorose infecciosa". Também BOTERO (14, 1940), como já mencionamos em outra parte deste trabalho, aventando a hipótese de que a presença de malváceas doentes em plantações de algodão poderia contribuir para maior incidência da doença *"Stenosis"*, referiu-se ainda expressamente à existência de possíveis insetos vetores comuns. Não obstante essas suposições, não foi ainda,

ao que saibamos, efetuado um estudo comparativo sistemático entre a "clorose infecciosa" das malváceas e o mosáico ou outras doenças do algodoeiro. Parece-nos porem, que talvez observações dessa natureza sejam agora facilitadas pela identificação do inseto vetor da "clorose infecciosa" das malváceas. De maneira análoga poder-se-á averiguar, futuramente, se existe realmente qualquer relação entre a "clorose infecciosa" das malváceas e o "mosáico da mandioca", doença que representa para certas regiões da Africa e Ásia tropical um verdadeiro flagelo. Naturalmente também outras doenças transmitidas por *Bemisia tabaci* ou espécies afins de aleirodídeos, como por exemplo uma doença da batata dôce, recentemente descrita por HANSFORD (34, 1944), devem ser incluidas nos programas de estudos de cunho semelhante.

Do resultado de tais experiências depende, pois, a eventual necessidade de se recomendarem medidas de combate à "clorose infecciosa" das malváceas, como, por exemplo, a erradicação total ou parcial das malváceas doentes de determinadas plantações econômicas.

Diante da importância que se atribuiu, durante dezenas de anos, à suposta falta de disseminação natural da "clorose infecciosa" das malváceas, merece ainda ser delineada, embora apenas em forma de um rápido esboço, a provavel área geográfica da propagação natural desta doença, a qual deve estar relacionada, de maneira interessante, com os limites da ocorrência espontânea dos vetôres.

A "clorose infecciosa" em espécies de malváceas pertencentes à vegetação natural do campo, isto é, em espécies não artificialmente propagadas pelo homem, foi encontrada e estudada por KUNKEL (49, 1930) em Haiti e na península da Florida no sul dos Estados Unidos. COOK (18, 1931) referiu-se com algum detalhe à disseminação natural desta doença entre as malváceas de Puerto Rico e publicou ilustrações dos sintomas por ele observados em plantas naturalmente infeccionadas das espécies *Abutilon hirtum* (SWEET.), *Sida carpinifolia* L. e *Sida rhombifolia* L.. Esses sintomas, aliás, lembram perfeitamente os descritos mais tarde por um de nós em Malváceas da vegetação espontânea do Brasil. DALE (22, 1943) menciona a ocorrência natural da "clorose infecciosa" em plantas de *Sida* sp. e *Malachra alceifolia* na ilha de Trinidad.

Por SILBERSCHMIDT (69, 1943) e ORLANDO e SILBERSCHMIDT (58, 1945) foi observada a propagação natural da mesma doença no Estado de São Paulo. Sabemos que a doença existe também em outros Estados do Brasil, especialmente nos do Norte e Nordeste. Assim, fomos informados gentilmente, por uma carta do Dr. PEDRITO SILVA,

de Uruçuca, de que no Estado da Bahia é frequente uma doença em *Sida* sp., caraterizada por manchas cloróticas, assimétricas, das fôlhas; e já recebemos outras informações valiosas, acompanhadas de remessas de material do herbário dos agrônomos J. DESLANDES e M. ALVES DE OLIVEIRA, a respeito da presença da doença "clorose infecciosa" no Estado da Paraíba. Algumas indicações a respeito da ocorrência da "clorose infecciosa" em málváceas da vegetação espontânea do Estado de Paraíba encontram-se no trabalho de SILBERSCHMIDT (70, 1945). Provavelmente também a doença de *Sida*, que BOTERO (14, 1940) encontrou em plantas de *Sida* espalhadas nos algodoais da Colômbia, seja idêntica à "clorose infecciosa", por nós pesquisada. Todas as indicações, até agora citadas, referem-se aos trópicos (e a uma estreita faixa dos subtrópicos) do Novo Mundo. Mas a ocorrência e a disseminação natural de doenças de virus em malváceas silvestres foi também observada na Africa. Por exemplo, já antes da publicação dos referidos trabalhos de KUNKEL e COOK, MC KINNEY (56, 1929) perto de Accra, na Costa do Ouro, encontrou plantas de *Hibiscus calycinus* atacadas por um mosáico amarelo. As manchas, que essas fôlhas exibiam, e que podem ser muito bem observadas na fotografia que documenta aquele trabalho, são exatamente do tipo das provocadas pela "clorose infecciosa". Também uma parte das observações de autores posteriores refere-se à Africa Ocidental, principalmente à Sierra Leone e à Costa do Ouro, como as referências de DEIGHTON (25, 1938) e SHEPHERD (67, 1938). Outros pesquisadores, porem, por exemplo HORNBY (38, 1933) e STOREY (78, 1935) constataram a ocorrência de doenças de virus em malváceas silvestres também na Africa Oriental. Nestes casos, porem, não possuimos elementos para afirmar que o virus causador dessas doenças seja exatamente igual ao agente da "clorose infecciosa" por nós estudado. Finalmente merece ser mencionado que PAL e TANDEN (61, 1937), até no Norte da Índia, na Ásia, depararam malváceas naturalmente infeccionadas por doenças de virus.

Parece-nos, porem, que as informações se tornam tanto mais escassas quanto mais avançamos para leste, o que corrobora a idéia de que a America equatorial, especialmente as ilhas chamadas de Índia Ocidental, representam o centro da disseminação natural da "clorose infecciosa". Resta agora averiguar se a área da disseminação natural da doença em questão de fato coincide com os limites geográficos, dentro dos quais é encontrado o vetor *Bemisia tabaci*.

De acôrdo com as indicações de SMITH (72, 1937), que naturalmente não incluem ainda os achados mais recentes, a ocorrência deste

inséto foi averiguada na Índia, e indivíduos, provavelmente da mesma espécie, foram coletados também no Sudão, no sul da Nigéria, na Africa Oriental, no Iraque e em Java. Como se vê, SMITH não se refere ainda à presença do inseto em questão, na America.

Nas considerações que tecemos até agora, tentamos mostrar as consequências que a descoberta de um vetor natural da "clorose infecciosa" pode trazer para o melhor conhecimento desta doença. Devemos, porem, lembrar que esta mesma descoberta igualmente vem possibilitar a realização de estudos mais apurados de laboratório, sôbre o *virus* responsavel por esta doença.

Como é sabído, o virus da "clorose infecciosa" das malváceas, até há pouco sómente considerado como transmissivel por enxertia (7, 1904) (8, 1906) (24, 1929) (49, 1930) (27, 1931) (44, 1932) (69, 1943) (70, 1945) e sob certas condições, provavelmente por semente (52, 1907) (39, 1933) (40, 1934), nunca foi também, até os nossos dias, propagado pelo suco das plantas afetadas (7, 1904) (8, 1906) (24, 1929) (49, 1930) (27, 1931) (69, 1943) (70, 1945), o que sem dúvida tem impedido que se realizassem estudos para determinação das propriedades gerais desse virus, que como se sabe são sempre relacionados aos sucos das plantas doentes.

Como consequência, porem, da atual possibilidade de transmissão do virus da "clorose infecciosa" das malváceas por inseto, os estudos relativos às propriedades gerais desse virus poderão agora, talvês, ser realizados nos moldes já traçados pelos conhecidos trabalhos de CARTER (16, 1927) (17, 1928), SEVERIN (66, 1928), STOREY (75, 1932) e outros.

Nesses trabalhos, como se sabe, os autores descreveram dispositivos e meios nutritivos artificiais que possibilitam a alimentação de insetos sugadores através de membranas, com suco de plantas doentes, préviamente sujeito aos tratamentos desejados. Esta técnica tornou viavel também a determinação das propriedades gerais de alguns virus, que não sendo propagáveis por suco, fossem pelos menos transmissíveis por intermédio de insetos-vetores. A efetuação de estudos semelhantes foi agora possibilitada pela verificação da existência de um inseto-vetor para o virus da "clorose infecciosa" das malváceas.

Tais estudos poderiam fornecer os dados que nos faltam ainda quanto ás propriedades gerais desse virus, ou esclarecer pelo menos alguns aspetos, também obscuros, ligados à questão da não transmissibilidade dêsse virus pelo suco das plantas afetadas.

STUDIES ON THE NATURAL DISSEMINATION OF THE VIRUS OF THE "INFECTIOUS CHLOROSIS" OF MALVACEAE (ABUTILON VIRUS 1. BAUR) AND ITS RELATION TO THE INSECT-VECTOR *BEMISIA TABACI* (GENN.). (HOMOPTERA-ALEYRODIDAE)

Abstract

1, The natural dissemination of the "Infectious Chlorosis" has been observed by us during successive years among the Malvaceous plants, belonging to the spontaneous vegetation, which covers some plots of the experimental area of our Institute.

2, With the purpose to study the natural dissemination of the "Infectious Chlorosis" with more detail and without the difficulty resulting from the occurrence of non-malvaceous weeds in the plot under observation, we cleaned it from any vegetation and organized in it four plant beds, which received a determined number of healthy seedlings of Sida rhombifolia.

A sketch of this plantation is given in fig. 1, in which the healthy plants are represented by the mark "-". In two of the beds we set rows of diseased plants of Sida rhombifolia (indicated by "."), supposed to serve as focus of natural infection and alternating with the rows of healthy specimens of the same species. In the two remaining beds the diseased plants were set along one of the border lines. The whole plot was kept continuously clean from any weeds.

Four months after the organization of the beds, only 86 of the 1096 originally healthy plants of Sida rhombifolia or 7,87% had escaped from natural infection by the "Infectious Chlorosis". All the test plants originating from the same seed sample and kept in an insect-proof greenhouse had remained healthy during the same period.

3, In another plot of our experimental field we established two small plantations of healthy seedlings of Sida rhombifolia in flower pots isolated from each other and from the rest of the field by water ditches covered with Paris green (fig. 2). By this device we wished to verify, if insects belonging to the sub-class of Apterygota, i. e. groups without winged forms, are able to transmit the "Infectious Chlorosis". A month after the organization of the "artificial islands" we noticed the first case of the disease among the plants of one of the flower pots and a few days later we recorded two more cases of "Infectious Chlorosis". From these experiments we drew the conclusion, that the vectors of the "Infectious Chlorosis" belong to the sub-class of Pterygota.

4, Already before the results of our preliminary experiments, described in the items 2 and 3, were available we had started collecting insects of different groups, principally those found on diseased plants of Sida rhombifolia in the plant beds represented by fig. 1. In order to test the eventual relation of these insects to the transmission of the "Infectious Chlorosis", we transferred the collected specimens immediately to healthy plants of this species, growing in cages under controlled conditions. These transmission experiments were performed along four different lines of procedure: a) A batch of 5-15 insects of the same species was transferred to one single healthy plant, growing in the greenhouse and which was caged individually after being infested; b) the insects, collected in the field were first bred on healthy plants in the greenhouse, then fed on diseased plants and then tested as described under a); c) A batch, this time of 30-40 specimens, was transferred to a bigger cage placed in the greenhouse and containing some healthy plants of Sida rhombifolia surrounding one or more diseased ones, which served as focus of the infection; d) The bigger cages, described under c) were placed in the experimental field.

5, Making use of these four methods, we studied the transmissibility of the virus of the "Infectious Chlorosis" by the one species of acari and the twenty species of insects listed in table I pg. 15.

The experiments with the acarus and with all these species of insects, gave thoroughly negative results. We consider interesting this result, because some of the insect species tested like Myzus persicae, Aphis gossypii and Agalliana sticticollis are concerned with the transmission of other virus diseases of plants. It may be stressed here, that the number of insects tested of some of these species was rather high, amounting to 1660 the number of specimens of Myzus persicae, to 3812 that of Aphis gossypii and to 915 that of Agallia albidula, included in these experiments.

6, Still during the course of these experiments, we verified, that one of our big cages placed in our experimental field and containing healthy and diseased plants of Sida rhombifolia had suffered an infestation only by white flies and that some of the originally healthy plants had begun exhibiting symptoms of the "Infectious Chlorosis".

7, Based upon these observations, we collected white flies from the cage in which the spontaneous transmission of the disease (by this insect) had been observed, or from our experimental field, and bred them directly on diseased plants of Sida rhombifolia. Only adults, belonging to the first or second generation of the descendence of the collected specimens, were used in our transmission experiments. The healthy plants infested in these experiments by batches of insects suspected of being viruliferous, belonged to the species Sida rhombifolia and Abutilon striatum var. spurium.

The results of the experiments, in which the insects were tested on single and individually caged plants (procedure a, item 4) are condensed in table 2, pag. 17, whereas Table 3 refers to the experiments, in which groups of plants enclosed in a bigger cage were infested (procedure e, item 4).

The data of table 2 show us, that all of the 29 tested plants of Sida rhombifolia and 18 of the 25 tested plants of Abutilon striatum var. spurium, infested by the species of "white flies", lateron identified as being Bemisia tabaci (Genn.), got infected with the "Infectious Chlorosis" of Malvaceous. By making use of the other described procedure (table 3), we succeeded in infecting experimentally 30 plants of Sida rhombifolia and 22 of Abutilon striatum var. spurium. All the test plants of these two species, not infested by Aleyrodidae, remained healthy, during the whole period of observation. The time, elapsed from the infestation of the plants by the insects until the appearance of the first symptoms of the disease, varied in the species Sida rhombifolia from 5 to 28 days and in the species Abutilon striatum var. spurium from 12 to 45 days.

8, Finally, we wished to verify, which minimum number of insects of Bemisia tabaci (Genn.) is sufficient for transmitting the disease to a healthy plant of Sida rhombifolia. We were interested in this problema by practical reasons as well as by the fact, that many authors, working on the transmission of other virus diseases by Bemisia tabaci had stressed the convenience or even the necessity of using great numbers of insects for obtaining positive results. In our own experiments, the results of which are condensed in Table 4. (pg. 28), we could prove, that one single insect, either male or female, is sufficient to transmit the disease. The transmission by individual females, however, occurred

in a higher percentage of cases than by single males. In general, the efficiency of the transmission of the "Infectious Chlorosis" by individual specimens was verified to be low, but to improve quickly with the increasing number of insects and to reach the maximum already by the use of as few as 10 insects by plant. In those experiments it was further possible to observe (Table 4, pg. 21), that the healthy plants, infested with specimens of Bemisia tabaci, reared on healthy plants never manifested the symptoms of the disease under study.

9, In the discussion, we point out, that many of the theories about the spontaneous origin of viruses, which were mostly based on the supposed lack of a vector responsible for natural dissemination of the "Infectious Chlorosis" of Malvaceae, lost their principal support by our observations. Such theories have been conceived, for instance by BAUR *(7-8, 1904, 6),* MORITZ *(47, 1933)* WOODS *and* DU BUY *(89-90, 1943) and* DARLINGTON *(23, 1944).*

Besides explaining the theoretical consequences of our findings, we try in the discussion to set forth the eventual economical importance of the "Infectious Chlorosis". Since the insect Bemisia tabaci, which we showed in this paper to be responsible for the transmission of the "Infectious Chlorosis" is known as the vector of many diseases of economical plants, like tobacco "leaf-curl" (76, STOREY *1932), cotton leaf curl (43,* KIRKPATRICK *1931) and cassava mosaic (80,* STOREY *e* NICHOLS *1938), it is possible that we shall learn by future experiments, that the control of the "Infectious Chlorosis" of Malvaceae may be beneficial for crops of econmical plants.*

In an other part of our discussion we draw a sketch of the probable geographical limits of the area of the natural dissemination of the "Infectious Chlorosis", showing the relation of this problem to the spontaneous occurrence of wild species of Malvaceous plants as well as to the existence of the natural vector of the disease in the same area.

BIBLIOGRAFIA

1 — AFZAL HUSAIN, M. — 1930 — Leaf curl in cotton. *Nature*, 126: 958.

2 — ANONIMO — 1932 — Virus diseases of tobacco in Nyasaland. *Nyas. Dept. Agric. Bull.*, 2: 15 pp. Referência em *R. A. M.*, 11: 806.

3 — ANONIMO — 1942 — Agricultural Research. *Rep. Imp. Counc. Agric. Res. New Delhi, 1940-1941*, p. 36. Referência em *R. A. M.*, 21: 342.

4 — ANONIMO — 1942 — Sumatra fight pseud.-mosaic disease. Foreign Crops Mark., *U. S. Dept. Agric.:* 10 pp. Referência em *R. A. M.*, 21: 473.

5 — ANONIMO — 1942 — Agricultural Research. *Rep. East Afr. Agric. Res. Sta. 1941:* 3 pp. Referência em *R. A. M.*, 22: 7, 1943.

6 — ANONIMO — 1943 — Agricultural Research. *Rep. Imp. Counc. Agric. Res., New Delhi, 1941-1942,* pp. 3-39. Referência em *R. A. M.*, 22: 381, 1943.

7 — BAUR, E. — 1904 — Zur Aetiologie der infektiösen Panaschierung. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, 22: 453-460. (In Phytopathological classics. Number 7, 55-62 translated from German by J. Johnson, Published by the American Phytopathological Society, 1942.)

8 — BAUR, E. (1) — 1906 — Weitere Mitteilungen über die infektiöse Chlorose der Malvaceen und über einige analoge Erscheinungen bei Ligustrum und Laburnum. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, 24: 416-428.

9 — BERKELEY, G. H. — 1938 — Leaf curl of Geranium. *Canad. Hort.* 61: 108. Referência em *R. A. M.*, 17: 684.

10 — BERTUS, L. S. — 1942 — Plant pathology. *Adm. Rep. Dir. Agric. Ceylon, 1941,* p. D5. Referência em *R. A. M.*, 22: 197, 1943.

11 — BERTUS, L. S. — 1943 — Plant pathology. *Adm. Rep. Dir. Agric. Ceylon, 1942,* p. D5. Referência em *R. A. M.*, 23: 165, 1944.

12 — BEWELEY, W. F. (2) — 1922 — Eighth. Ann. Rept. Cheshunt. Exp. and Res. Stat. Herts, pp. 34-45.

13 — BLATTNY, C. — 1929 — Mosaika konvalinky (Convallaria majalis L.). *Ochrana Rostlin,* 9: 19-21. Referência em *R. A. M.*, 8: 589.

14 — BOTERO, R. O. — 1940 — La Stenosis. *Publ. Min. Econ. nac. Colombia,* 16 pg.

15 — BRIERLEY, P. — 1944 — Virus described primarily on ornamental or miscellaneous hosts. *Plant. Dis. Reporter,* Suppl. 150: 410-482.

16 — CARTER, W. — 1927 — A technic for use with homopterous vectors of plant diseases, with special reference to the sugar-beet leaf hopper, Eutettix tenellus Baker. *Jour. Agr. Research,* 34: 449-451.

17 — CARTER, W. — 1928 — An improvement in the technique for feeding homopterous insects. *Phytopath.* 18: 246-247.

18 — COOK, M. T. — 1931 — New virus diseases of plants in Porto Rico. *The Journ. of the Dept. of Agric. of Puerto Rico,* 15: 193-195.

19 — COOK, M. T. — 1946 — *Plant viruses and plant diseases.* Mimeographed by the Dept. of Bot. of the Louisiana State University, 243 pp.

20 — COSTA, A. S. e R. FORSTER — 1939 — Uma suspeita molestia de virus do fumo, (Nicotiana tabacum L.) semelhante a "Leaf-curl", presente no Estado de São Paulo. *Jornal de Agronomia,* 2: 295-303.

21 — COWLAND, J. W. — 1934 — Gezira Entomological Section, G. A. R. S. Final Report on experimental work, 1932-33. Ann. Rept. Gezira. Agric. Res. Serv. for the year ended 31st December, 1933, pp. 107-125. Referência em *R. A. M.*, 13: 697.

22 — DALE, W. T. — 1943 — Preliminary studies of the plant viruses of Trinidad. *Trop. Agric.*, 20: 228-235.

23 — DARLINGTON, C. D. — 1944 — Heredity, development and infection. *Nature,* 154: 164-169.

24 — DAVIS, E. F. — 1929 — Some chemical and physiological studies on the nature and transmission of "infectious chlorosis" in variegated plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 16: 145-213.

25 — DEIGHTON, F. C. — 1938 — Tobacco leaf curl in Sierra Leone, Pap. Third W. Afr. Agric. Conf. 1; 7-8. Referência em *R. A. M.*, 19: 568, 1940.

26 — ELZE, D. L. — 1931 — The relation between insect and virus as shown in potato leaf roll, and a classification of viroses based on this relation. *Phytopath.*, 21: 675-686.

27 — EULER, H. V. — 1931 — Recherches chimiques sur l'action de deux virus des végétaux. II. Comptes rendus et Communications, pp. 459-461. Referência em *R. A. M.*, 11: 592, 1932.

28 — FRANÇOIS, E. — 1937 — Un grave péril. La "mosaique" du manioc. *Agron. Colon.*, 26: 33-38. Referência em *R. A. M.*, 17: 94, 1938.

29 — FRAPPA, C. — 1938 — Les insects nuisibles au Manioc sur pied et aux tubercules de Manioc en magasin à Madagascar. *Rev. de Bot. Appliquée et d'Agriculture Tropicale 18 année*, Bulletin Mensuel p. 17-29 e 104-109.

30 — GÄUMANN, E. — 1945 — *Pflanzliche Infektionslehre.* Verlag Birkhäuser, Basel, 611 pp.

31 — GOLDING, F. D. — 1930 — A vector of leaf curl of cotton in Southern Nigeria. *Empire cotton growing Review*, 7: 120-126. Referência em *R. A. M.* 9: 651.

32 — GOLDING, F. D. — 1935 — A probable vector of Cassava mosaic in Southern Nigeria. *Trop. Agriculture, Trin.* 12: 215.

33 — GOLDING, F. D. — 1936 — Bemisia nigeriensis Corb., a vector of Cassava mosaic in Southern Nigeria. *Trop. Agriculture, Trin.*, 13: 182-186.

34 — HANSFORD, C. G. — 1944 — A probable virus disease of sweet potato. *East African Agr. Journal*, 10: 126/7. Referência em *Exp. Stat. Rec.* 93: 593, 1945.

35 — HERTZSCH, W. — 1927 — Beiträge zur infektiösen Chlorose. *Zeitschr. für Bot.*, 20: 65-85. Referência em *R. A. M.*, 7: 385-386, 1928.

36 — HOLMES, F. O. — 1939 — *Handbook of phytopathogenic viruses.* Burgess publishing Company — Minneapolis, Minnesota, 221 pp.

37 — HOPKINS, J. C. F. — 1932 — Leaf curl of tobacco in Southern Rhodesia. *Rhod. Agric. Journ.* 29: 680-686. Referência em *R. A. M.*, 12: 58-59, 1933.

38 — HORNBY, A. J. W. — 1933 — Report of the Assistant — Director and Agricultural Chemist; *Ann. Rept. Dept. of Agric. Nyasaland 1932*, 36-42. Referência em *R. A. M.* 13, 1934, 274.

39 — KEUR, J. Y. — 1933 — Seed transmission of the virus causing variegation of Abutilon. *Phytopath.*, 23: 20.

40 — KEUR, J. Y. — 1934 — Studies of the occurrence and transmission of virus diseases in the genus Abutilon. *Bull. Torrey Bot. Club*, 61: 53-70.

41 — KIRKPATRICK, T. W. — 1930 — Leaf curl in Cotton. *Nature:* 125: 672.

42 — KIRKPATRICK, T. W. — 1930 — Preliminary note on leaf-crinkle of Cotton in the Gezira area, Sudan. *Bull. Entomol. Res.*, 21: 127-137.

43 — KIRKPATRICK, T. W. — 1931 — Further studies on leaf curl of Cotton in the Sudan. *Bull. Entomol. Res.*, 22: 323-363.

44 — KLEBAHN, H. — 1932 — Fortsetzung der experimentellen Untersuchungen über Alloiophyllie und Virus-Krankheit. *Phytopath. Zschr.*, 4: 1-36. Referência em *R. A. M.*, 11: 256-257.

45 — KÖHLER, E. — 1932 — Allgemeines über Viruskrankheiten bei Pflanzen. *Angewandte Botanik*, 24, 4: 334-348.

46 — KÖHLER, E. — 1938 — Über eine neue, in Gewächshaus angetroffene Virus-Krankheit. (Glanzkrankheit). *Angew. Bot.*, 20: 373-380. Referência em *R. A. M.*, 18: 196-197, 1939.

47 — KRENKE, N. P. — 1933 — *Wundkompensation, Transplantation und Chimaeren bei Pflanzen.* Übersetzt von N. Busch, Redigiert von O. Moritz, Julius Springer, 934 pp.

48 — KUFFERATH, H. e J. CHESQUIÈRE — 1932 — La mosaïque du manioc. *Comptes Rendus Soc. Biol.*, 109: 1146-1148. Referência em *R. A. M.*, 11: 621.

49 — KUNKEL, L. O. — 1930 — Transmission of Sida mosaic by grafting. *Phytopath.*, 20: 129.

50 — KUNKEL, L. O. — 1943 — New hosts as a key to progress in plant virus disease research. Publ. em: *Virus diseases* — Cornell University Press, Ithaca, pp. 63-82.

51 — LEACH, J. G. — 1940 — *Insect transmission of plant diseases.* Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York and London. 615 pp.

52 — LINDEMUTH, H. (3) — 1907 — Studien über die sogenannte Panaschüre und über einige begleitende Erscheinungen. *Landwirtschafliche Jahrbücher*, 36: 807-861.

53 — MATHUR, R. N. — 1932 — Leaf curl of Cotton in garden Zinnias in North India. *Nature*, 129: 797.

54 — MATSUMOTO, T. e R. TATEOKA — 1940 — Virus diseases of tobacco in Formosa. *Trans. Nat. Hist. Spc. Formosa*, 30: 31-33. Referência em *R. A. M.*, 19: 620.

55 — MC CLEAN, A. P. D. — 1940 — Some leaf curl diseases in South Africa. *Sci. Bull. Dep. Agric. S. Africa*, 225: 72 pp. Referência em *R. A. M.*, 21: 167-168, 1942.

56 — MC KINNEY, H. H. — 1929 — Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Jour. Agric. Res.* 39: 557-578.

57 — MOORE, E. S. — 1933 — Important to tobacco growers. The crinkly dwarf menace of tobacco. *Farming in South Africa*, 8: 276.

58 — ORLANDO, A. e K. SILBERSCHMIDT — 1945 — O vetor da "Clorose Infecciosa" das Malváceas. *O Biologico*, S. Paulo, 11: 138-140.

59 — PADWICK, G. W. — 1939 — Report of the Imperial Mycologist. *Sci. Rep. Agric. Res. Inst., New Delhi, 1937-38*, pp. 105-112. Referência em *R. A. M.*, 18: 499-501.

60 — PADWICK, G. W. — 1940 — Report of the Imperial Mycologist. *Sci. Rep. Agric. Res. Inst., New Delhi, 1938-39*, pp. 103-115. Referência em *R. A. M.*, 19: 583-584.

61 — PAL, B. P. e R. N. TANDEN — 1937 — Types of Tobacco leaf curl in Northern India. *Indian J. Agric. Sci.*, 7: 363-393.

62 — PRUTHI, H. S. e C. K. SAMUEL — 1937 — Entomological investigations on the leaf curl disease of tobacco in North Bihar (I e II). *Indian J. Agric. Sci.*, 7: 659-670.

63 — PRUTHI, H. S. e C. K. SAMUEL — 1942 — Entomological investigations on the leaf curl disease of tobacco in North Bihar (V). *Indian J. Agric. Sci.*, 12: 35-57.

64 — PRUTH, H. S. — 1945 — Leaf curl disease of tobaco in India. *Indian Fmg.*, 5: 220-223. Referência em *R. A. M.*, 24: 292.

65 — Roelofsen, P. A. — 1945 — Recent Research at the Deli Tobacco Experiment Station, em: Honig e Verdoorn, *Science and Scientists in the Netherlands Indies*, New York City, 1945, 491 p., aqui p. 286-287 (Estudos de Dr. van der Weij.).

66 — Severin, H. H. P. e O. Swezy — 1928 — Filtration experiments on curly top of sugar beets. *Phytopath.*, 18: 681-690.

67 — Shepherd, E. F. S. — 1938 — Tobacco leaf curl. *Pap. Third West Afr. Agric. Conf. 1938*, pp. 87-89. Referência em *R. A. M.*, 19: 568.

68 — Silberschmidt, K. — 1938 — O mosáico da mandioca. *O Biológico*, São Paulo, 4: 177-181.

69 — Silberschmidt, K. — 1943 — Estudos sôbre a transmissão experimental da "Clorose Infecciosa " das malváceas. *Arq. do Instituto Biológico*, S. Paulo, 14: 105-155.

70 — Silberschmidt, K. — 1945 — Observações suplementares sôbre a transmissão experimental da "Clorose Infecciosa" das malváceas. *Arq. do Inst. Biológico*, S. Paulo, 16: 49-64.

71 — Smith, K. M. — 1927 — Observations on the insect carriers of mosaic disease of the potato. *Ann. Appl. Biology*, 14: 113-131.

72 — Smith, K. M. — 1937 — A *textbook of plant virus diseases*. J. e A. Churchill Ltd. London, 615 pp.

73 — Smith, K. M. — 1945 — Plant viruses. *Endeavour*, 4: 22-28.

74 — Storey, H. H. — 1931 — A new virus disease of the tobacco plant. *Nature*, 128: 187-188.

75 — Storey, H. H. — 1932 — The filtration of the virus of streak disease of maize. *Ann. Appl. Biology*, 19: 1-5.

76 — Storey, H. H. — 1932 — Report of the plant pathologist. *Fourth. Ann. Rept. East African Agric. Res. Stat., Amani, 1931-32*, pp. 8-13. Referência em *R. A. M.*, 12: 143.

77 — Storey, H. H. — 1934 — Report of the plant pathologist. *Sixth. Ann. Rept. East African Agric. Res. Stat., Amani, 1933-34*, pp. 10-14.

78 — Storey, H. H. — 1935 — Virus diseases of East African plants: II — Leaf curl disease of tobacco. *East Afr. Agric. J.*, 2: 148-153. Referência em *R. A. M.*, 15: 118, 1936.

79 — Storey, H. H. — 1937 — Report of the plant pathologist. *Rep. E. Afr. Agric. Res. Stat., 1936-37*, pp. 17-20. Referência em *R. A. M.*, 17: 160-161, 1938.

80 — Storey, H. H. e R. F. W. Nichols — 1938 — Studies of the mosaic of Cassava. *Ann. Appl. Biology*, 25: 790-806.

81 — Storey, H. H. — 1939 — Rep. East African Agric. Res. Stat., pp. 8-11. Referência em *R. A. M.*, 20: 102, 1941.

82 — Storey, H. H. — 1940 — Plant pathology. *Rep. E. Afr. Agric. Res. Sta., 1939*, pp. 8-11. Referência em *R. A. M.*, 20: 102-103, 1941.

83 — Thung, T. H. — 1932 — De Krul — en Kroepoek — ziekten van tabak en de oorzaken van hare verbreiding. *Proefstat. Vorstenlandsche tabak, Meded.*, 72: 54 pp. Referência em *R. A. M.*, 11: 478-479.

84 — Thung, T. H. — 1939 — Phytopathologische waarnemingen. *Meded. Proefst. Vorstendl. tab.*, 87: 23-46. Referência em *R. A. M.*, 18: 554-555.

85 — Uppal, B. N. et al. — 1940 — Yellow mosaic of Bhendi. *Curr. Sci.*, 9: 227-228. Referência em *R. A. M.*, 20: 242-243, 1941.

86 — VAN DER LAAN, P. A. — 1939 — Verslag van het Deli Proefstation over het yaar 1938. *Meded. Deli. Proefst.*, Ser. 3, 3. 38 pp. Referência em *R. A. M.*, 18: 765.

87 — VAN DER LAAN, P. A. — 1940 — Motschildluis en Eupatorium als oorzaken van pseudo-mosaik. *Vlugschr. Deli — Proefst. Medan.*, 67. 4 pp. Referência em *R. A. M.*, 20: 280-281, 1941.

88 — WEST, J. — 1936 — Leaf curl of tobacco in Southern Nigeria. *Trop. Agriculture, Trin.*, 13: 242-244.

89 — WOODS, M. e H. G. DU BUY — 1943 — Evidence for the evolution of phytopathogenic viruses from the chondriome. *Phytopath.*, 33: 20.

90 — WOODS, M. W. e H. G. DU BUY — 1943 — Evidence for the evolution of phytopathogenic viruses from mitochondria and their derivates. I, Cytological and genetic evidence. *Phytopath.* 33: 637-655.

———o———

NOTA — Os trabalhos assinalados com os números 1, 2 e 3, foram consultados respectivamente pelos referatos de Davis (24, 1929), Kirkpatrick (43, 1931) e Brierley (15, 1944).

Vol. 17 — Art. 2 Setembro de 1946

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS COCCÍDEOS DO BRASIL
(HOMOPTERA - COCCOIDEA)

POR

H. S. Lepage e O. Giannotti

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 20 figuras no texto

Examinando material coletado no Estado de São Paulo, principalmente na zona de Campos de Jordão, e material enviado a este Instituto por técnicos de outros estados do Brasil, verificamos a existência de cinco espécies novas de coccídeos, todas pertencentes á familia *Diaspidae* e tribu *Diaspidini*, quatro das quais foram incluidas no gênero *Pseudoparlatoria* COCKERELL e uma no gênero *Diaspis* COSTA.

Damos abaixo a descrição dessas espécies, com algumas notas, a-fim-de mostrar sua semelhança com outras do mesmo gênero, e, alem disso, para realçar os principais caracteres que servem para identifica-las.

Pseudoparlatoria trimaculata, sp. n.

Figs. 1-4

Fêmea adulta aproximadamente circular, levemente alongada, medindo em lamina cêrca de 1 milímetro de comprimento. Derme membranosa, com exceção do pigídio, que se apresenta esclerosado. Pigídio arredondado, com três pares de lobulos, sendo o 1.º e 2.º par bem visiveis e o 3.º par inconspicuo. Lobulos medianos pequenos, bem separados, com espinhos glandulares bifurcados entre as bases. Segundo par de lobulos arredondado e distintamente bilobado.

Nos primeiros e segundo espaço interlobulares notam-se espinhos glandulares simples, que, como os existentes entre os lobulos medianos, são cêrca de três vezes mais compridos do que os lobulos.

Macroductos dorsais distribuidos na margem do pigídio, notando-se um entre os lobulos medianos, um no primeiro espaço interlobular, 2 no 2.º espaço interlobular e de 4-6 depois do 3.º par de lobulos.

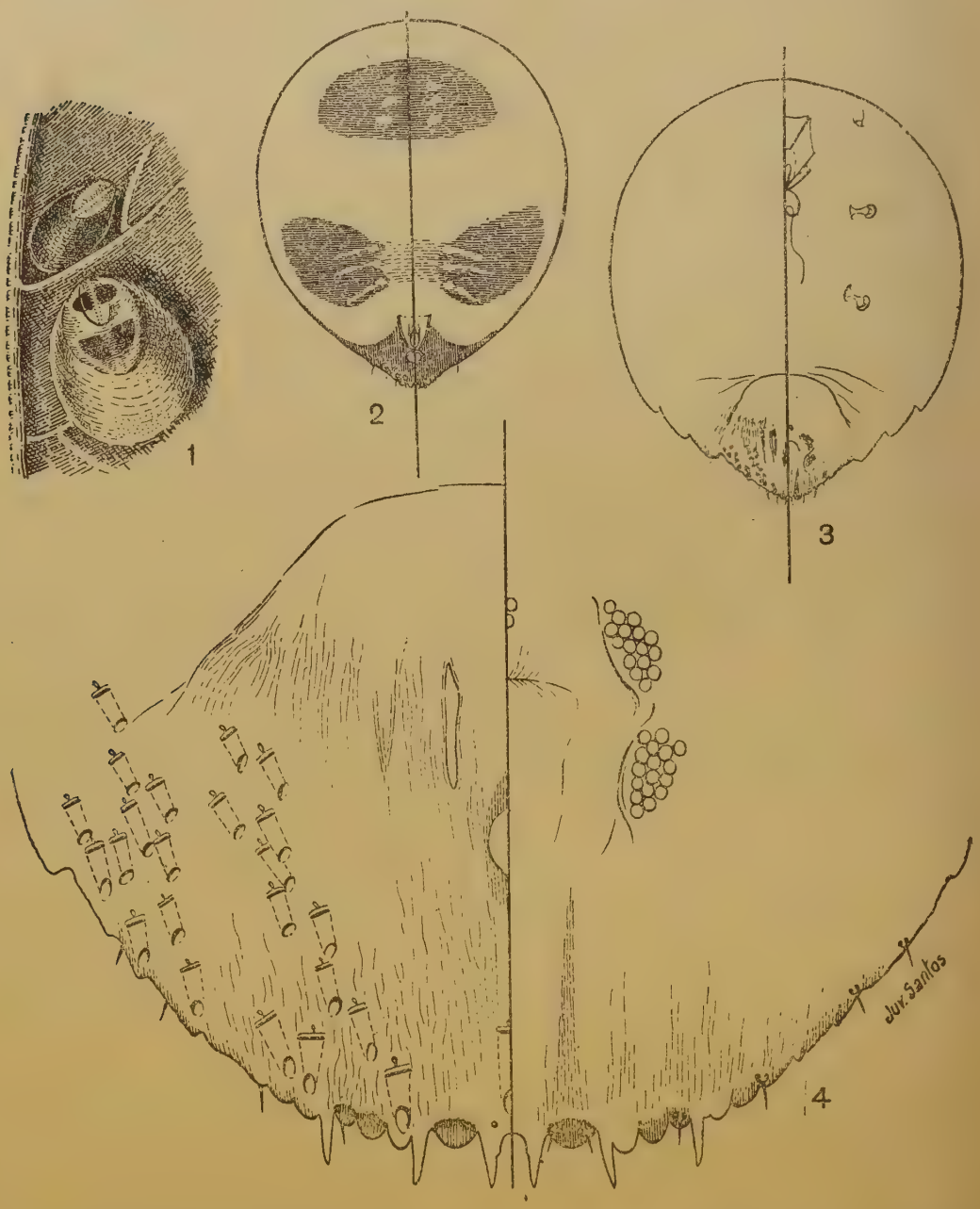
Alem desses macroductos marginais, nota-se uma serie de macroductos dorsais de tamanho um pouco menor, e que se acham localizados numa zona submarginal do pigídio.

Orificio anal de dimensões regulares, localizado abaixo do centro do pigídio e póros perivulvares distribuidos em 5 grupos, possuindo o grupo mediano de 4-5 póros.

Segunda exúvia completamente diferente das outras espécies de *Pseudoparlatoria*, pois tem três zonas pigmentadas, sendo uma anterior, grande, locali-

zada no meio da exúvia, e duas laterais, menores do que a primeira e localizadas na parte posterior da exúvia.

Escudo da fêmea, circular, amarelado, com exúvias subcentrais, onde se pode notar as três manchas pigmentadas, já referidas na descrição. Escudo do macho menor, alongado e de côr amarela.



Pseudoparlatoria trimaculata, sp. n.: Fig. 1 - Escudos feminino e masculino aumentados; fig. 2 - Segunda exúvia larval × 24; fig. 3 - Fêmea adulta × 24; fig. 4 - Pigídio da fêmea adulta × 50.

Esta espécie assemelha-se muito a *Pseudoparlatoria maculata* FERRIS; entretanto, pode-se facilmente fazer a distinção, pois que em *P. maculata* existe apenas uma zona pigimentada na segunda exúvia e os espinhos glandulares são do mesmo comprimento que os lobulos

Pseudoparlatoria multipunctata, sp. n.: Fig. 5 - Escudos femininos sôbre folha de planta indeterminada; fig. 6 - Escudos femininos e masculinos aumentados; fig. 7 - Fêmea adulta × 20; fig. 8 - Pigídio da fêmea adulta × 80.

do pigídio, ao passo que na espécie em questão existem três zonas pigmentadas na segunda exúvia e os espinhos glandulares são bem mais longos do que os lobulos.

Habitat — Encontrado em folhas de planta indeterminada, em Campos de Jordão, Estado de São Paulo, em 4-1945, pelo Eng.º Agr.º FRANCISCO DE PAULA MELLO.

Material tipico — Incorporado às coleções do Instituto Biológico (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) e do Departamento de Zoologia do Estado de São Paulo.

Pseudoparlatoria multipunctata, sp. n.

Figs. 5-8

Corpo da fêmea adulta, de forma oval, de cêrca de um milímetro de comprimento em lamina, derme membranosa, com exceção do pigídio, que é esclerosado. Três pares de lobulos pigídiais bem desenvolvidos, sendo o par mediano grande, com uma faixa fortemente esclerosada na base, de forma triangular e com as margens crenuladas. Segundo e terceiro par de lobulos menores, bílobados, notando-se em cada lobulo um pequeno entalhe de cada lado. Espinhos glandulares longos, notando-se um entre os lobulos medianos, bifurcado, um no primeiro e segundo espaço interlobular, e um ou dois depois do 3.º par de lobulos.

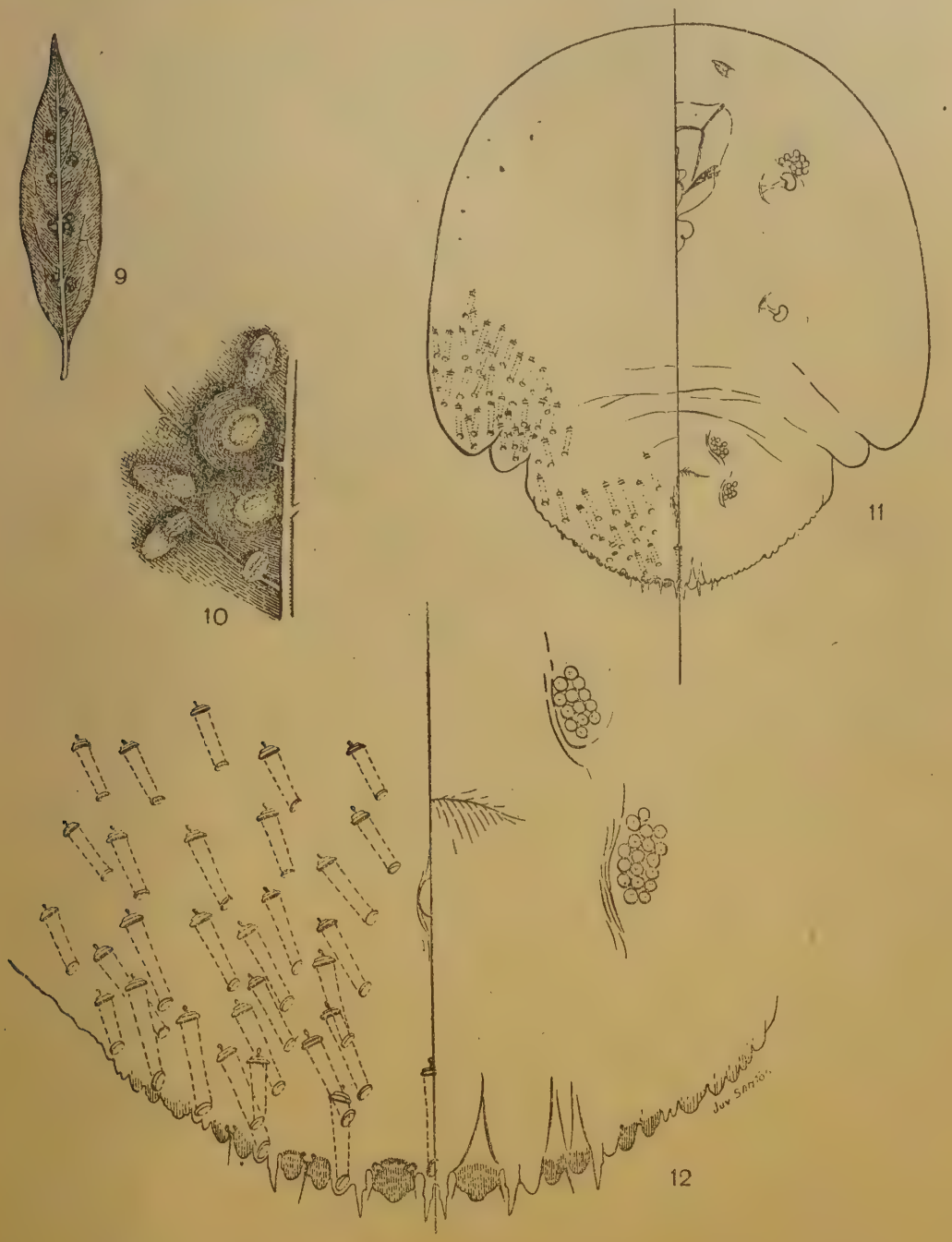
Macroductos marginais largos e compridos, distribuidos na margem do pigídio, sendo um entre os lobulos medianos, um entre o 1.º e 2.º par de lobulos, um entre o 2.º e 3.º par de lobulos e de 3-4 depois do 3.º par de lobulos. Macroductos dorsais identicos aos marginais e localizados irregularmente numa zona submarginal do pigídio. Ao redor de todo o corpo, começando nos ultimos segmentos abdominais, nota-se a existencia de uma série de pequenos ductos, de aspéto tipico, não conhecidos em outras espécies de *Pseudoparlatoria*. Abertura anal de tamanho regular, situada um pouco abaixo do centro do pigídio. Póros perivulvares presentes em 5 grupos. Escudo da fêmea de côr amarelo-clara, pequeno, com exúvias subcentrais.

Das espécies do gênero *Pseudoparlatoria*, apenas uma, *P. punctata* FERRIS, tem certa semelhança com a que acabamos de descrever, pelo fato de apresentar uma serie simples de pequenos ductos marginais ao redor do corpo da fêmea, compreendendo o torax e a cabeça.

Entretanto, em *P. multipunctata* esses ductos são muito mais numerosos, e sua forma é completamente diferente das encontrados em *P. punctata*. Alem disso, o comprimento dos macroductos marginais e dorsais do pigídio, que são bem mais longos em *P. multipunctata*, destinguem perfeitamente as duas espécies.

Habitat — Encontrado em folhas de planta indeterminada, em Campos de Jordão, Estado de São Paulo, pelo Eng.º Agr.º FRANCISCO DE PAULA MELLO, em 4-1945.

Material tipico — Incorporado às coleções do Instituto Biológico (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) e do Departamento de Zoologia do Estado de São Paulo.



Pseudoparlatoria Gomescostai, sp. n.: Fig. 9 - Escudos femininos sôbre folha de *Eugenia pungens;* fig. 10 - Escudos femininos e masculinos aumentados; fig. 11 - Fêmea adulta × 21; fig. 12 - Pigídio da fêmea adulta × 84.

Pseudoparlatoria Gomescostai, sp. n.

Figs. 9-12

Fêmea adulta de forma arredondada, medindo cerca de 1 milímetro de comprimento, derme membranosa, com exceção do pigídio, que se apresenta levemente esclerosado. Pigídio com três pares de lobulos, sendo os medianos de tamanho regular, arredondados, com um pequeno entalhe de cada lado. Segundo e terceiro par de lobulos menores, distintamente bilobados.

Espinhos glandulares distribuidos de acôrdo com as carateristicas do gênero, e cêrca de duas vezes mais longos do que os lobulos.

Macroductos marginais compridos, cilindricos, notando-se um em cada espaço interlobular e de 3-4 depois do 3.º par de lobulos. Macroductos dorsais identicos aos marginais, irregularmente distribuidos, extendendo-se para fora do pigídio até a altura do segundo par de estigmas toraxicos. Á medida que se afastam do pigídio, os macroductos vão diminuindo, até ficarem reduzidos a cêrca da metade do tamanho dos macroductos marginais. Abertura anal pequena, situada aproximadamente no centro do pigídio; póros perivulvares distrbuidos em quatro grupos.

Escudo da fêmea, circular, de côr escura, com exúvias centrais, de côr amarelo-clara. Escudo do macho, menor e alongado.

Alem de outros caracteres secundarios, a quantidade enorme de macrodutos dorsais, extendendo-se para fora do pigídio, distingue esta de outras espécies de *Pseudoparlatoria.*

Habitat — Encontrado em folhas de *Eugenia pungens*, no Rio Grande do Sul pelo Eng.º Agr.º R. Gomes Costa em 4-1945.

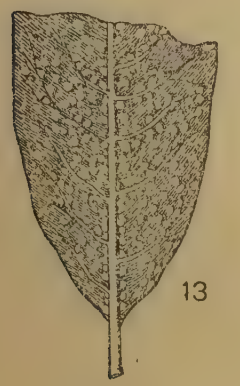
Material tipico — Incorporado às coleções do Instituto Biológico (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) e do Departamento de Zoologia do Estado de São Paulo.

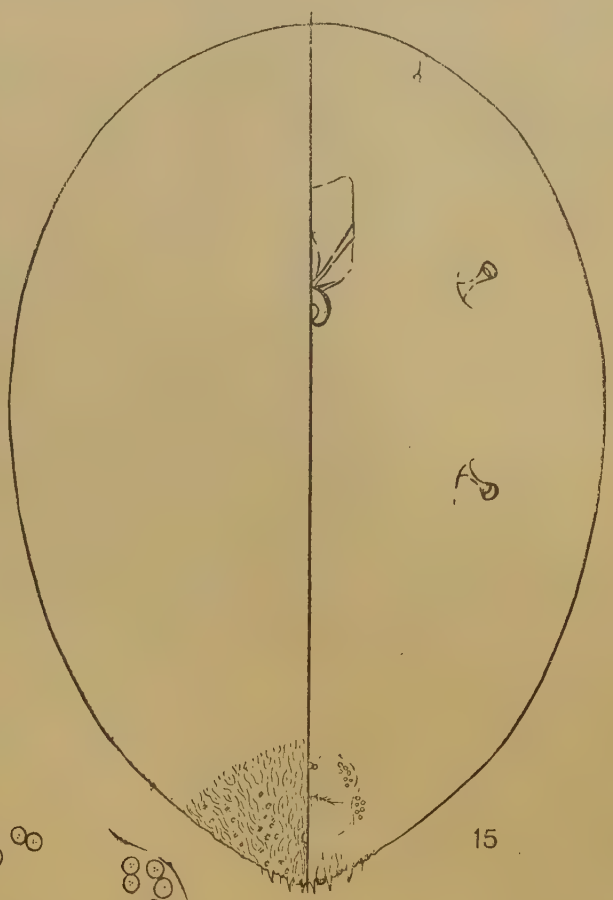
Pseudoparlatoria campinensis, sp. n.

Figs. 13-16

Fêmea adulta medindo cêrca de 0,75 milímetros em lamina. Corpo de forma ovalada, apresentando-se completamente membranoso, com exceção do pigídio. Pigídio relativamente pequeno em comparação com o restante do corpo, apresentando 3 pares de lobulos, sendo o 3.º apenas representado por uma pequena saliencia pouco conspicua. Lobulos medianos arredondados, não zygoticos, longamente afastados e separados por um par de espinhos glandulares que se unem formando um conjunto com aspéto de rabo de peixe. Os lobulos medianos são de comprimento bem menor que os espinhos glandulares. Segundo par de lobulos bilobados, pouco desenvolvidos. Adiante do 3.º lobulo a margem do pigídio é simples, sem nenhum caracter especial. Macroductos dorsais em numero muito reduzido. Um simples macroducto entre o 1.º e 2.º par de lobulos, outro entre o 2.º e 3.º par de lobulos, um par de macroductos submarginais ao nivel do 5.º segmento e apenas 4 grandes macroductos dorsais ao nivel da abertura anal. Alem dos espinhos glandulares medianos bifidos, ha um entre o 1.º e 2.º par de lobulos, e outro entre o 2.º e 3.º par de lobulos, mais longos que os lobulos.

Espinhos dorsais localizados conforme desenho que ilustra esta descrição. Abertura anal situada no centro do pigídio, pouco mais para traz, relativamente grande. Póros perivulvares presentes em 5 grupos com numero pequeno de póros.





Pseudoparlatoria campinensis, sp. n.: Fig. 13 - Escudos femininos sôbre folha de planta indeterminada; fig. 14 - Escudos femininos e masculinos aumentados; fig. 15 - Fêmea adulta × 40; fig. 16 - Pigídio da fêmea adulta × 114.

Escudo da fêmea adulta, de côr branca, feltroso, com exúvias de côr amarela, subcentrais. O escudo apresenta a parte ventral bem desenvolvida. Escudos masculinos sempre encontrados em numero elevadissimo em relação aos femininos, alongados, brancos, semelhantes em textura aos da fêmea, com exúvia terminal.

Esta espécie assemelha-se a *Pseudoparlatoria parlatorioides*, entretanto não só a forma do lobulo dos espinhos glandulares, como o aspéto geral do pigídio, separa as duas espécies.

Habitat — Encontrado em Campinas, em 29-3-945, pelo primeiro autor sôbre planta não determinada.

Material tipico — Incorporado às coleções do Instituto Biológico (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) e do Departamento de Zoologia do Estado de São Paulo.

Diaspis paulista, sp. n.

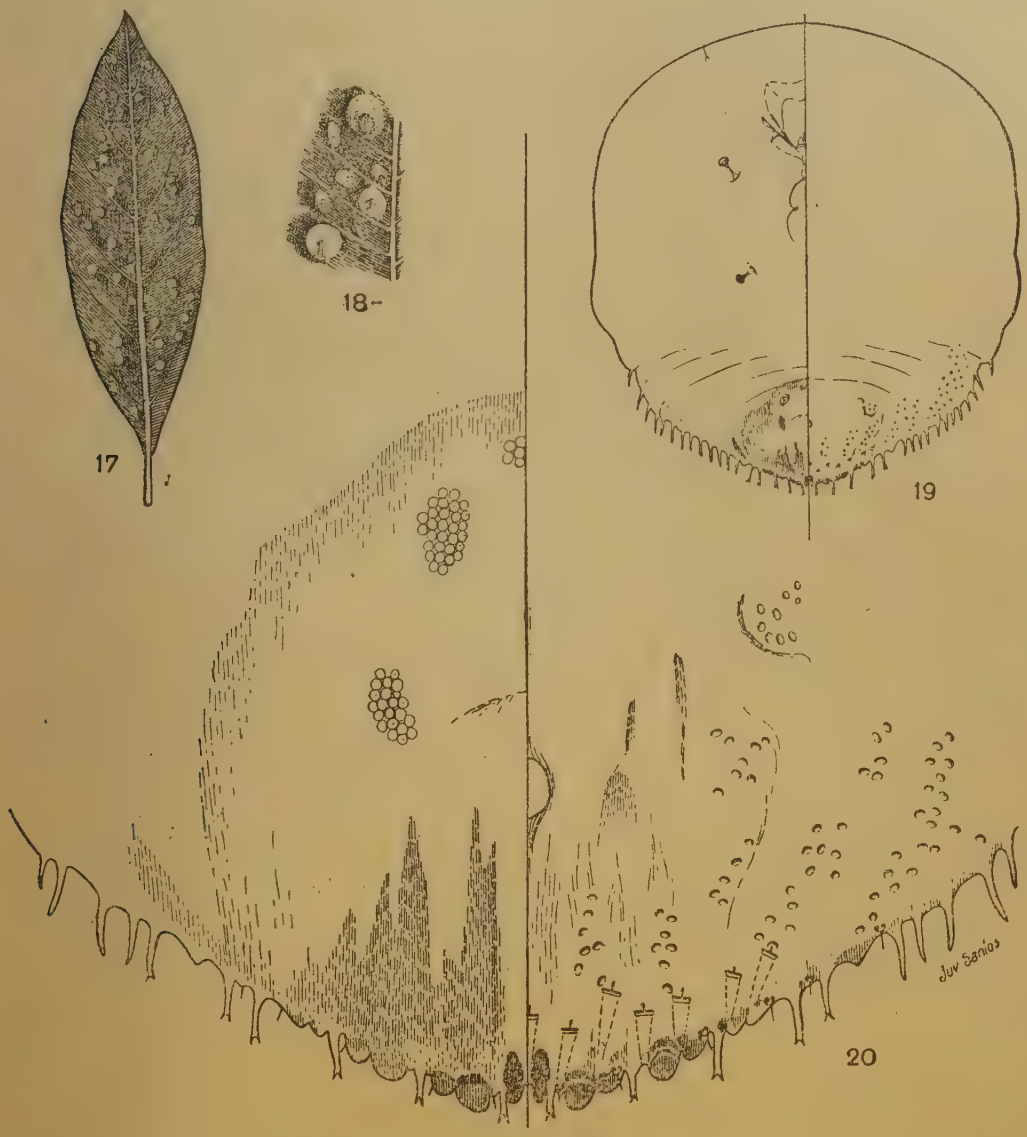
Figs. 17-20

Fêmea adulta arredondada, medindo em lamina cêrca de 1 milimetro de comprimento, derme membranosa, com exceção do pigídio, onde se notam algumas manchas esclerosadas. Pigídio de tamanho normal, apresentando três pares de lobulos bem desenvolvidos, sendo os medianos muito pequenos, compridos e estreitos, paralelos, formando um entalhe mediano. Segundo e terceiro par de lobulos, cêrca de três vezes maiores do que os medianos, profundamente bilobados. Um pouco acima do terceiro par de lobulos nota-se a existencia de uma proeminencia distintamente esclerosada, que os autores americanos denominam *"gland-spur"*, e que é um caracter tipico do gênero. Não existem espinhos glandulares entre os lobulos medianos, notando-se um em cada espaço interlobular seguinte, bifidos, e de 12-15 depois do terceiro par de lobulos sendo alguns destes bifidos e outros simplesmente pontudos.

Macroductos marginais normalmente distribuidos, isto é, um entre os lobulos medianos, um em cada espaço interlobular, um na base dos segundo e terceiro par de lobulos, e de dois a três depois do terceiro par de lobulos. Macroductos dorsais iguais ao da margem do pigídio, distribuidos regularmente em fileiras e grupos sôbre os segmentos do abdomem. Abertura anal regular, situada um pouco abaixo do pigídio, póros perivulvares presentes e distribuido em cinco grupos. Escudo da fêmea, arredondado, chato, de cêrca de dois milimetros de diametro, amarelo-claro, com exúvias centrais ou subcentrais, e de côr levemente mais clara que o resto do escudo. Escudo do macho, menor e alongado.

Esta espécie tem de caracteristico o tamanho muito reduzido dos lobulos medianos, carater que é encontrado em numero pequeno de outras espécies. Entretanto, a forma dos lobulos e a sua disposição no pigídio, o numero e a regular distribuição dos macroductos dorsais, e finalmente o aspéto dos espinhos glandulares, distinguem-na das outras espécies.

Habitat — Encontrado em folhas de plantas indeterminadas, em Campos de Jordão, Estado de São Paulo, pelo Eng.º Agr.º FRANCISCO DE PAULA MELLO, em 4-1945.



Diaspis paulista, sp. n.: Fig. 17 - Escudos femininos sôbre folha de planta indeterminada; fig. 18 - Escudos femininos e masculinos, pouco aumentados; fig. 19 - Fêmea adulta × 22: fig. 20 - Pigídio da fêmea × 105.

Material tipico — Incorporado às coleções do Instituto Biológico (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) e do Departamento de Zoologia do Estado de São Paulo.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF BRAZILIAN COCCIDAE
(HOMOPTERA-COCCOIDEA)

Abstract

In the present paper, the following five species from Brazil have been described as new to science: Pseudoparlatoria trimaculata, Pseudoparlatoria multipunctata, Pseudoparlatoria campinensis and Diaspis paulista, collected in the State of S. Paulo, and Pseudoparlatoria Gomescostai collected in the State of Rio Grande do Sul. The five species belong to the family Diaspididae, tribe Diaspidini.

BIBLIOGRAFIA

FERRIS, G. F. — 1937-1942 — Atlas of the scale insects of North America. Stanf. Univ. Pr., California, 1: 31-44, 116-117; 3: 276-278, 316-319; 4: 414-421.

LEPAGE, H. S. — 1938 — Catalogo dos Coccideos do Brasil. *Rev. Mus. Paulista*, São Paulo, 23: 327-491.

LEPAGE, H. S. — 1942 — Descrição de onze espécies novas de coccideos do Brasil. *Arq. Inst. Biologico*, São Paulo, 13: 178-189.

LEPAGE, H. S. e O. GIANNOTTI — 1943 — Notas Coccidologicas. *Arq. Inst. Biologico*, São Paulo, 14: 331-350.

Vol. 17 — Art. 3 Setembro de 1946

OBSERVAÇÕES SÔBRE ESPÉCIES DO GÊNERO "ELSINOË" DE UGANDA

POR

Anna E. Jenkins e A. A. Bitancourt

Do Departamento da Agricultura dos Estados Unidos
e do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 1-2

Na sua recente lista de 16 espécies de *Elsinoë* encontradas em Uganda, Africa Oriental, HANSFORD (1946 [1], p. 10) incluiu *Elsinoë* spp. sôbre *Basella alba, Cissus* sp., *Lovoa brownii* e *Markhamia platycalyx*. Especimens dessas espécies, assim como *Sphaceloma* sôbre *Entandrophragma angolense* e *Elsinoë* sôbre *Sida cordifolia* nos foram remetidos pelo Dr. HANSFORD para serem descritas.

Elsinoë basellae BITANCOURT & JENKINS n. sp.

Estampa 1, *A* e *B*

Manchas das fôlhas epifilas ou hipofilas, fortemente salientes e visiveis na face oposta, pela acentuada depressão que causam no limbo, arredondadas ou irregulares, principalmente quando dispostas sôbre as nervuras, onde são mais alongadas, medindo de 0,2 a 1,5 mm de diâmetro, com superficie lisa ou apenas levemente áspera ou enrugada, às vezes com alguma desagregação dos tecidos superficiais, de côr parda *(vinaceous buff* a *wood brown)* [2] nitidamente delimitadas dos tecidos sãos e mesmo, às vezes, um tanto constritas na periferia. Nos peciolos as manchas são numerosas, salientes, alongadas no sentido do comprimento do orgão afetado, coalescendo em lesões mais ou menos extensas e irregulares, de côr mais escura que as manchas das fôlhas.

Ascomas extremamente reduzidos, medindo 30-120 × 25-35 μ com estrutura rudimentar, formando pequenas massas mal delimitadas de pseudoparênquima hialino no seio dos tecidos de paredes escuras, fortemente desorganizados, do hospedeiro, usualmente na superfície destes últimos, mas ocasionalmente nos tecidos mais profundos, contendo alguns ascos globosos, de cerca de 20 μ de diâmetro, onde se acham contidos até 8 ascosporos hialinos, munidos de 1 a 3 septos transversais, medindo 10-15 × 4-5 μ.

Maculae amphigenae, in facie una multo elevatae, opposite, depressa, subcirculares vel elongatiores, 0,2-1,5 mm diam., leves vel paulo rugulosae, vinaceobubalinae usque umbrinae, bene delimitatae; cancri in petiolis numerosi, elevati, elongati, in areas extensas et irregulares coalescentes, obscuriores quam in foliis; ascomata parce evoluta, hyalina, conspersa, interdum profunde immersa; asci sparsi, globosi, 20 μ diam., usque octospori; ascosporae hyalinae, 1-3 septatae, 10-15 × 4-5 μ.

---

[1] HANSFORD, C. G. — 1946 — The foliicolous ascomycetes their parasites and associated fungi especially as illustrated by Uganda specimens. Mycological Papers n.º 15, Imp. Mycol. Inst. Kew, Surrey, 240 pp.

[2] As côres são indicadas aproximadamente em português. A indicação precisa em inglês é baseada em: RIDGWAY, R. Color standards and color nomenclature, 43 pp. 1921.

Distribuição: produzindo uma verrugose das fôlhas de bertalha (*Basella alba* L., Quenopodiaceas) em Uganda.

Especimen examinado: Rifle Range, Kiagwe, Uganda, Junho de 1942, C. G. HANSFORD 3024 (IB 4677, USM 74530).[3]

Pela estrutura rudimentar de seus ascomas, esta espécie aproxima-se de *E. menispermacearum*, *E. arrudae*, *E. urerae* e da espécie tipo do gênero, *E. canavaliae*.

Elsinoë lovoae JENKINS & BITANCOURT n. sp.

Estampa 1, *C* e *D*

Manchas das fôlhas na sua grande maioria hipofilas, porém visiveis na face oposta por uma ligeira depressão ou deformação do limbo, geralmente acompanhada de um escurecimento dos tecidos, em alguns casos com necrose mais ou menos acentuada. Estas manchas hipofilas são extremamente irregulares, embora muitas vezes de contorno geral grosseiramente circular, de dimensões variaveis, de 1 mm até 1 cm de diâmetro, usualmente de 3 a 5 mm, salientes, de beiras muito irregulares, ocasionalmente finamente lobadas, muito bem delimitadas dos tecidos sãos, isoladas ou coalescentes, ás vezes distribuidas ao longo das nervuras secundárias, ocasionalmente ao longo e ao lado da nervura central, mas em regra irregularmente espalhadas em todo o limbo ou mais especialmente nas suas beiras superiores, com superfície plana e levemente deprimida no centro nas manchas grandes, áspera ou acidentada nas manchas menores e às vezes finamente granulosa quando provida de frutificações do fungo causal, irregularmente coloridas de tons pardos mais ou menos escuros (*fawn color* e *bone brown*) geralmente mais escuras na periferia e nos lugares cobertos de frutificações do fungo causal. Algumas manchas apresentam rasgadura e mesmo perfuração completa dos tecidos da fôlha. As raras manchas epifilas são menores, mais irregulares e de superfície mais rugosa que as hipofilas. Nos peciolos e nas hastes as manchas têm aproximadamente os caracteres das manchas das fôlhas mas são mais alongadas no sentido do comprimento do orgão, e com saliência mais acentuada das beiras, que também pelo escurecimento, contrastam mais com o centro da mancha.

Nas raras manchas ferteis os ascomas são vistos como ligeiros abaulamentos, muito juntos uns dos outros, o que empresta à superfície da mancha um aspecto granuloso; em secção transversal eles apresentam uma conformação pulvinada, medem 60 a 120 μ de diâmetro por 40 a 50 μ de altura e são constituidos de um pseudoparênquima escuro, que se estende para dentro dos tecidos do hospedeiro e une lateralmente os diversos ascomas, passando, mais internamente ainda, para um prosênquima mais claro, que se insere entre os elementos celulares do hospedeiro. O pseudoparênquima dos ascomas é feito de elementos irregulares, porém isodiamétricos, medindo cerca de 5 μ de diâmetro e de paredes grossas, de côr parda escura, principalmente nas regiões mais externas, onde entretanto não há diferenciação de um verdadeiro epitecio. Os ascos são distribuidos no seio de nucleos pequenos de tecido pseudoparenquimático hialino, de paredes finas, na parte mais abaulada do pseudoparênquima escuro, e são globosos ou subpiriformes, medindo 22 a 26 μ de diâmetro, com parede interna grossa principalmente na parte apical

[3] Os números entre paranteses precedidos das iniciais IB referem-se a especimens do herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo. Os precedidos das inicais USM às Mycological Collections, Bureau of Plant Industry, Soils and Agricultural Engineering, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C.

e contendo 8 ascosporos hialinos munidos de 3 septos transversais, ocasionalmente, de um septo longitudinal em uma das células intermediárias ou nas duas, medindo 13-16 × 5-6 μ.

Maculae praecipue hypophyllae laminam penetrantes deim visibilis, margine perirregulari, 1-10 mm diam., prominentes, centro leniter depresso vel exascomatibus subasperatae, hinnuleae visque fuscae, margine versus obscurantes, interdum lacerata et deshiscentes plerumque conspersae, saepe in area apicifolii; cancri in caulibus et maculis in foliis simulans; ascomata pulvinata, 60-120 × 40-50 μ, pseudoparenchymatica, peripheriam versus obscurioria epithecio indefinito et asci in massis pseudoparenchymaticus hyalinis distributis; asci globosi vel obpyriformibus, 22-26 μ; ascosporae hyalinae, 3-septatae, interdum cellularis centralibus longitudinaliter 1-septatis 13-16 × 5-6 μ.

Distribuição: produzindo uma verrugose das fôlhas e hastes de *Lovoa brownii* SPRAGUE (Meliaceas) em Uganda.

Especimens examinados: Rifle Range, Kiagwe, Uganda, Junho de 1940, C. G. HANSFORD (Tipo: IB 3690, USM 90226); Entebbe Road, Uganda, Novembro de 1940, C. G. HANSFORD 2894 (IB 4812, USM 74720).

Sphaceloma entandrophragmae

JENKINS & BITANCOURT n. sp.

Estampa 1, *E*, *F* e *G*

Manchas das fôlhas salientes, muito numerosas, a maioria hipofilas, esparsas, às vezes em maior número em parte da fôlha, apical, marginal, ou de um só lado da nervura principal, então acompanhadas de necrose e perda do tecido atacado, geralmente circulares ou subcirculares, às vezes mais ou menos angulosas ou irregulares quando delimitadas pelas nervuras principal e secundárias, até 5 mm de diâmetro, podendo apresentar-se numa mesma fôlha com dimensões diversas, ou ao contrario e mais frequentemente, todas de tamanho semelhante, pulvinadas e mesmo salientes com superfície plana ou deprimida, de côr parda mais ou menos clara *(mummy brown* até *buff)*, com margem parda escura, superfície lisa ou ligeiramente áspera; na face oposta da fôlha as manchas são invisiveis ou então de côr parda escura, frequentemente com saliências concêntricas, com centro mais claro, papiraceo, que se desorganisa e cae facilmente, com margem ondulada, tornando-se por coalescência maiores e mais irregulares; cancros nas nervuras, peciolos e hastes muito numerosos, subcirculares, elípticos ou alongados, salientes, lisos ou ásperos, de côr parda clara *(pinkish buff* a *tilleul buff)*, frequentemente medindo até 4 × 2 mm mas podendo confluir e chegar a medir 13 × 4 mm.

Esporodoquios extremamente variaveis, às vezes formando pequenos botões fortemente salientes, 30-100 μ em diâmetro, por 40-60 μ de altura, outras vezes mais largos e menos altos, cobrindo praticamente, por coalescência, toda a superfície da parte central da lesão; hialinos e então de coloração rosa alaranjada muito pálida quando vistos na superfície da mancha, ou fuscos e então de côr parda mais ou menos escura vistos superficialmente; feitos de uma paliçada de conidioforos coalescentes, hialinos ou fuscos, assentados numa base mais ou menos desenvolvida de pseudoparênquima homogeneo, hialino. As conidias não foram vistas.

Maculae in foliis prominentes, numerosissimae, praecipue hypophyllae, majores laminam penetrantes, circularis vel irregulares, usque 5 mm diam., confluentes, pulvinatae et elevatae, superficie applanata vel depressa, brunneae usque bubalinae margine brunneo opposite brunnescentes centro papyraceo pallidiori; cancro vulgo in nervis, petiolis et caulibus numerosissimi, subcirculares et elliptica vel elongati, bubalini, usque 4 × 2 mm, vel coalescentes et majores; sporodochiis superficialiter punctiformibus, 80-100 μ in diam., 40-60 μ crassis, subinde in areas majores in centro maculae coalescentes, conidiophora hyalina vel fusca, cohaerentia; conidia non visa.

Distribuição: produzindo uma verrugose das fôlhas e hastes de *Entandrophragma angolense* C. DC. (Meliaceas) em Uganda.

Especimen examinado: Mitala Maria, Masaka Road, Uganda, 2 de Fevereiro de 1945, C. G. HANSFORD 3676 (IB 4964, USM 90167).

Elsinoë cissi JENKINS & BITANCOURT n. sp.

Estampa 1, *H*, *I* e *J*

Manchas das fôlhas epifilas ou hipofilas, visiveis na face oposta somente por uma depressão da fôlha que, no material sêco, tem às vezes coloração verde mais escura do que o resto da fôlha; algumas isoladas, esparsas e arredondadas, a maioria principalmente as da face inferior da fôlha, dispostas sôbre as nervuras, inclusive as mais finas que acompanham às vezes em suas ramificações, irregulares e alongadas, coalescentes, sobretudo nas nervuras principais e nos peciolos onde formam lesões mais ou menos extensas, muito salientes e bem delimitadas na periferia, com superfície um tanto rugosa, pequenas, raramente alcançando mais de 1 mm de diâmetro. As manchas menores têm diversos tons pardos mais ou menos escuros *(vinaceous buff* a *Natal brown)*, tons que também se observam na parte central em muitas das manchas maiores, cuja periferia, entretanto, e frequentemente também a totalidade da superfície, é mais clara, às vezes quase branca ou acinzentada, devido ao esvasiamento das células superficiais.

Nas hastes as manchas são irregulares, muito alongadas, levemente salientes, mais ou menos coalescentes em lesões extensas, de côr parda como as lesões das fôlhas, às vezes com superimposição de um pigmento acarminado.

Ascomas pouco salientes, medindo aproximadamente 100 μ de diâmetro por 50 μ de altura, às vezes de contorno mal definido, sem epitecio nitidamente diferenciado, feitos de um pseudoparênquima de paredes amarelas ou hialinas, em toda a periferia, hialina na parte central, que contem os ascos em duas ou 3 camadas irregulares. Os ascos são globosos ou um tanto alongados, medindo 16-20 × 14-18 μ, com parede interna espessa, e contêm até 8 ascosporos hialinos, munidos de 1 a 3 septos transversais, medindo 12-16 × 4-6 μ.

Maculae in foliis amphigenae, paulo laminam penetrantes, subcirculares, conspersa, vel saepe nervisequentes, usque 1 mm longis, coalescentes, elevatae, bene delimitatae, rugulosae, vinaceo-bubalinae vel brunneae, majores fere albae cancri in caulibus irregulares, elongati, subelevati, plus minusve coalescentes et extensae, interdum rosei; ascomata indefinita, circa 100 × 50 μ, leniter elevata, epithecio parce evoluti, obscura, pseudoparenchymatica, ascis in centro hyalino dispositis; asci in stratis uno vel duobus, octospori, globosi, 16-20 × 14-18 μ; ascosporae hyalinae, 1-3 septatae, 12-16 × 4-6 μ.

Distribuição: produzindo uma verrugose das fôlhas e hastes de *Cissus* sp. (Vitaceas), em Uganda.

Especimen examinado: Rifle Range, Kiagwe, Uganda, Junho de 1942, C. G. HANSFORD (IB 4552, USM 74429).

Elsinoë sidae BITANCOURT & JENKINS n. sp.

Estampa 1, *K* e *L*

Manchas das fôlhas, abundantes, salientes, principalmente hipofilas, frequentemente acompanhando as nervuras, de contorno variavel, pequenas, com aspecto de ferrugem, de côr parda clara *(cinnamon buff)*, esparsas, ou seguindo as nervuras menores, muitas vezes agrupadas ou efusas, em areas mais ou menos extensas, as quais são frequentemente limitadas pelas nervuras, tipicamente invisiveis na face superior salvo por uma leve discoloração de um verde mais pálido que o resto do limbo medindo até 5 mm.

Ascomas geralmente efusos, formando massas irregulares e de dimensões variaveis de estroma pseudoparenquimático hialino, mal delimitado em relação às células do hospedeiro; em alguns casos melhor definidos, pulvinados, com escurecimento dos elementos celulares externos do pseudoparênquima que assim formam um epitecio mais ou menos bem definido, medindo 45-170 μ de diâmetro, por 30 a 65 μ de espessura. Ascos imersos no pseudoparênquima e, quando este último é muito reduzido, aparentemente diretamente dentro do próprio tecido do hospedeiro, globosos, medindo até 22 μ de diâmetro, contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos transversais, com 12-14 × 5-6 μ.

Maculae in foliis numerosissimae praecipue hypophyllae, conspersae vel in aeris limitatis in forma variabilis, parvae, plerumque elevatae, instar rubigo, cinnamomeo-bubalinae, typica folium non penetrantes, aggregatae, usque effusae, saepe nervis delimitatae; ascomata in ambitu irregularia, epithecio tenui fusco 45-170 μ in diam. 30-65 μ crassa; asci globosi, octospori, usque 22 μ, ascosporae hyalinae, 3-septatae, 12-14 × 5-6 μ.

Distribuição: produzindo uma verrugose nas fôlhas de *Sida cordifolia* L. (Malvaceas), em Uganda.

Especimen examinado: Mile 13, Entebbe Road, Uganda, Março de 1940, C. G. HANSFORD 2592 (IB 4026, USM 73432).

Elsinoë markhamiae BITANCOURT & JENKINS n. sp.

Estampa 1, *M* e *N*

Manchas das fôlhas hipofilas, pequenas, medindo ¼ a ½ mm de diâmetro, angulares por serem delimitadas pelas nervuras mais finas da fôlha, resultando do esvasiamento das células superficiais do hospedeiro que se enchem de ar e emprestam à superfície da mancha uma coloração branca suja, com fina margem escura constituida pelas referidas nervuras, individualmente inconspicuas mas ordinariamente numerosas e coalescentes em uma área sêca, mais ou menos extensa, de margens mal definidas, onde as manchas se acham mais espaçadas e individualisadas, de coloração uniformemente branca suja, apenas entrecortada pelas linhas mais escuras das nervuras secundarias e pelo fino reticulo preto das nervuras ter-

ciarias, o qual entretanto desaparece pela dessicação mais completa das células superficiais nas partes mais centrais das áreas manchadas.

Ascomas visiveis na superfície das áreas manchadas como pequenas massas pretas salientes, intraepidérmicos, pulvinados, medindo 50-100 μ de diâmetro por 30-50 μ de altura,, constituidos por um pseudoparênquima hialino, feito de elementos celulares isodiamétricos, que medem cerca de 5 μ de diâmetro, coberto de 2 ou 3 camadas de células maiores e achatadas, de paredes escuras, que formam um epitecio bem diferenciado, de cerca de 10 μ de espessura. Os ascomas são usualmente repletos de ascos globosos em uma ou duas camadas, de 16 a 22 μ de diâmetro, com parede interna espessa, contendo até 8 ascosporos hialinos, com 1 a 3 septos transversais, constritos no septo mediano, com as duas células superiores mais grossas e curtas que as inferiores, medindo 14-16 × 5-6 μ.

Maculae in foliis minutae ¼ - ½ mm diam. inconspicuae, angulares, nervulis delimitatae, margine angusto, plerumque coalescentes, plus minusve extensae, alba usque sordidae albae; ascomata pulvinata, obscura, 50-100 × 30-50 μ, pseudoparenchymatica, epithecio bene evoluto, 10 μ crasso; asci in stratis uno vel duobus, octospori, globosi, 16-22 μ diam.; ascosporae hyalinae, 1-3 septatae, ad septum centralem constrictae, 14-16 × 5-6 μ.

Distribuição: produzindo uma antracnose das fôlhas de *Markhamia platycalyx* SPRAGUE (Bignoniaceas) em Uganda.

Especimen examinado: Kawanda, Uganda, Agosto de 1940, C. G. HANSFORD 2774 (IB 4813, USM 73766).

*
* *

Das sete novas espécies de *Elsinoë* de Uganda descritas por HANSFORD em 1941 [4], os autores receberam, enviados pelo Dr. HANSFORD, especimens de todas, salvo *Elsinoë tylophorae* sôbre *Tylophora* (Asclepiadaceas). Estes especimens foram fotografados, em tamanho natural, sob a direção do primeiro autor do presente trabalho, e secções de ascomas de 4 dentre êles foram feitas e fotografadas pelo segundo autor para um trabalho comparativo dos ascomas deste gênero (1940, [5] pag. 512). Algumas dessas fotografias estão representadas na estampa 2.

As espécies de *Elsinoë* e seus respectivos hospedeiros são: *Elsinoë adeniae* sôbre *Adenia* (Passifloraceas) (est. 2, *A* e *B*), *E. antiaridis* sôbre *Antiaris* (Urticaceas) (est. 2, *C* e *D*), *E. piperis* sôbre *Piper* (Piperaceas) (est. 2, *E* e *F*), *E. urerae* sôbre *Urera* (Urticaceas) (est. 2, *G* e *H*), *E. chandleri* sôbre *Mikania scandens* (Compostas) (est. 2, *I*) e *E. ugandensis* sôbre *Pseudospondias* (Anacardiaceas) (est. 2, *J*).

---

(4) HANSFORD, C. G. — 1941 — Contributions towards the Fungus Flora of Uganda. — III. Some Uganda Ascomycetes. Proc. Linnean Soc. London 153: 4-52.

(5) BITANCOURT, A. A. — 1940 — Variations in fructifications of *Elsinoë*, including descriptions of new species. Report of proceedings. Third International Congress for Microbiology. New York, Sept. 2-9-1939. 883 pp.

OBSERVATIONS ON SPECIES OF THE GENUS "ELSINOË" FROM UGANDA

Abstract

Technical descriptions are given of six new species of Elsinoë and Sphaceloma found in Uganda by C. G. HANSFORD, *viz.: Elsinoë basellae on Basella alba, E. lovoae on Lovoa brownii, Sphaceloma entandrophragmae on Entandrophragma angolense, E. cissi on Cissus sp., E. sidae on Sida cordifolia and E. markhamiae on Markhamia platycalyx.*

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

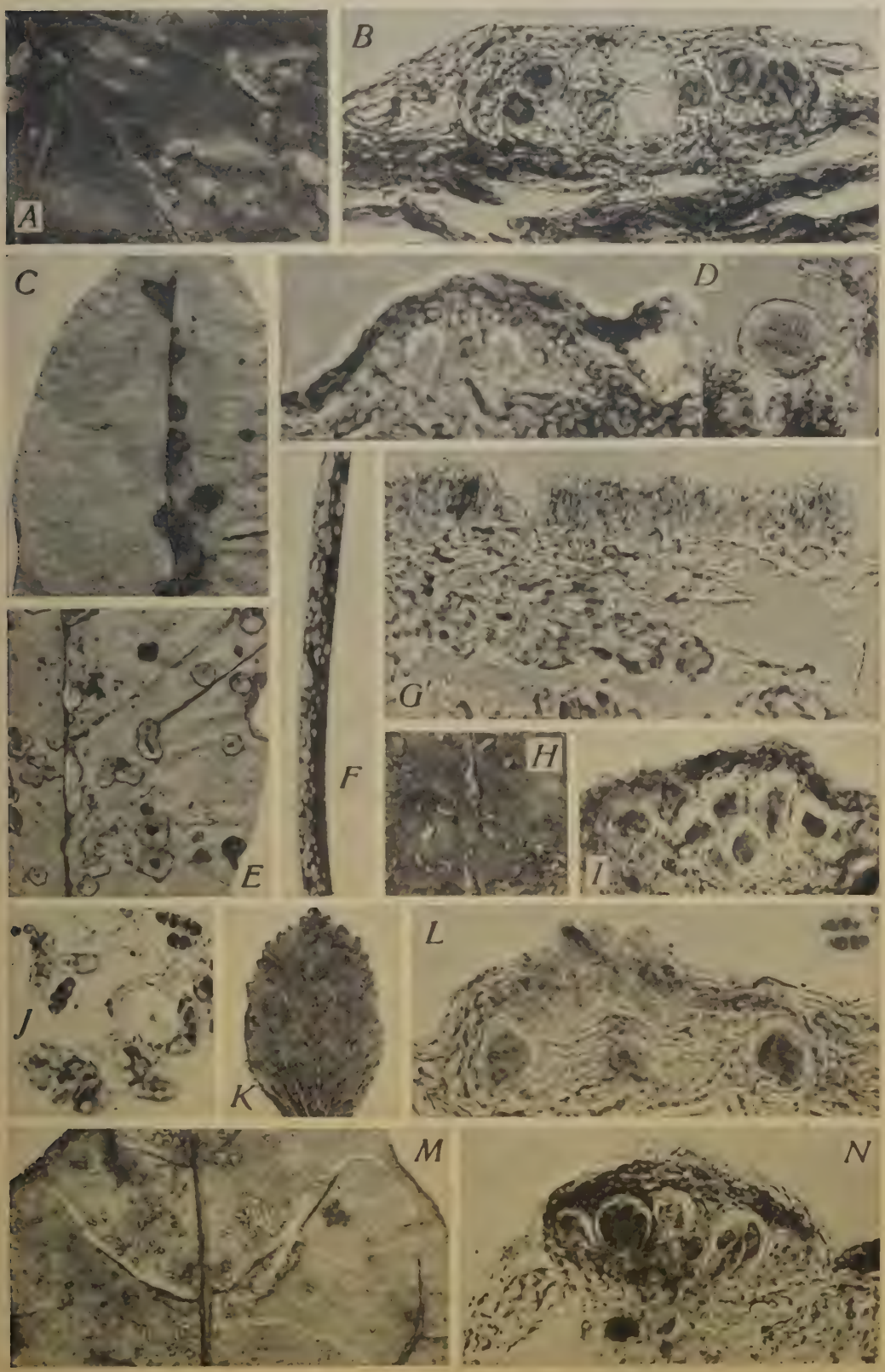
Novas espécies de *Elsinoë* e *Sphaceloma* de Uganda, manchas das fôlhas e hastes (× 1) e secções transversais de frutificações (× 500). *A*, *E. basellae* sôbre *Basella alba*, face superior da fôlha (× 3); *B*, ascoma (HANSFORD 3023). *C*, *E. lovae* sôbre *Lovoa brownii*, face inferior da fôlha; *D*, ascoma, à direita um asco (HANSFORD 2894). *E*, *S. entandrophragmae* sôbre *Entandrophragma angolense*, face inferior da fôlha; *F*, haste; *G*, esporodoquios (HANSFORD 3676). *H*, *E. cissi* sôbre *Cissus* sp., face superior da fôlha; *I*, ascoma; *J*, ascosporos (HANSFORD 3024). *K*, *Elsinoë sidae* sôbre *Sida cordifolia*, face inferior da fôlha; *L*, ascoma; em cima, ascosporos (HANSFORD 2592). *M*, *E. markhamiae* sôbre *Markhamia platycalyx*, face inferior da fôlha; *N*, ascoma (HANSFORD 2774).

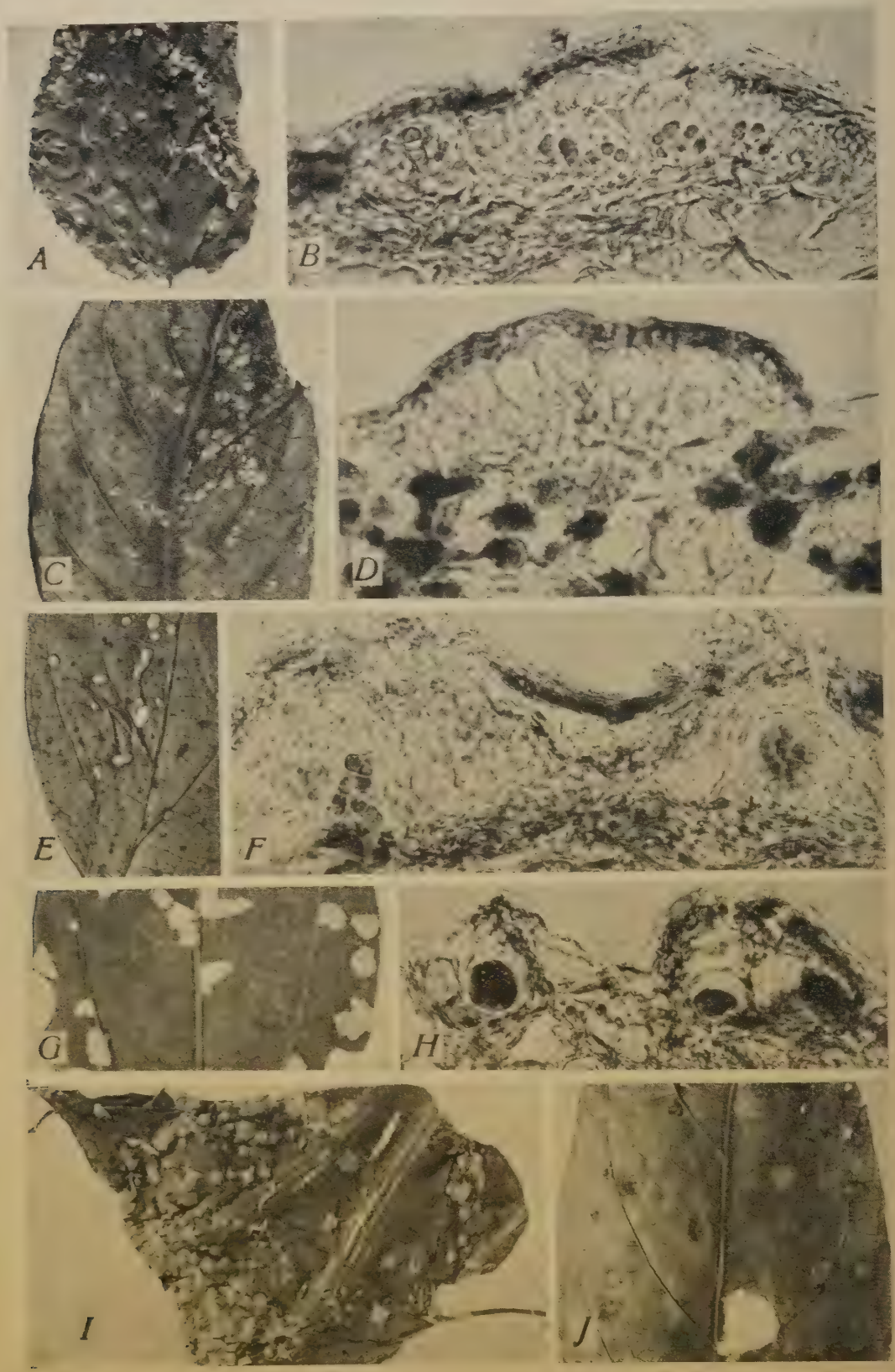
Fot. R. L. TAYLOR *(A, C, E, F, H, K* e *M)* e
A. A. BITANCOURT *(B, D, G, I, J, L* e *N)*

Estampa 2

Elsinoë spp. de Uganda, descritas por HANSFORD, mostrando as manchas das fôlhas (× 1) e secções de ascomas (× 500). *A*, *E. adeniae* sôbre *Adenia* sp., face inferior da fôlha (HANSFORD 3078); *B*, ascoma (HANSFORD 2459). *C*, *E. antiaridis* sôbre *Antiaris* sp., face inferior da fôlha (HANSFORD 2360); *D*, ascoma sôbre *A. usambarensis* (HANSFORD 2416). *E*, *E. piperis* sôbre *Piper capense*, face inferior da fôlha; *F*, ascomas (HANSFORD 2361). *G*, *E. urerae* sôbre *Urera cameroonensis*, face inferior da fôlha; *H*, ascomas (HANSFORD 2359). *I*, *E. chandleri* sôbre *Mikania scandens*, face superior da fôlha (HANSFORD 2450). *J*, *E. ugandensis*, sôbre *Pseudospondias microcarpa*, face inferior da fôlha (HANSFORD 2375).

Fot. M. L. FOUBERT *(A, C, E, G, I* e *J)* e
A. A. BITANCOURT *(B, D, F* e *H)*


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J

DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS DOS GÊNEROS "ELSINOË" E "SPHACELOMA" EM MISORE (SUL DA INDIA) (1)

POR

M. J. Thirumalachar (2)

Bangalore, India

Com 8 figuras no texto

O gênero das Miriangiales *Elsinoë* RACIB. compreende diversos bem conhecidos patógenos de plantas de importância econômica. De acôrdo com os tipos de sintomas as doenças por eles produzidas são vulgarmente chamadas "verrugoses" (*scab*) ou "antracnoses" (JENKINS, 1933). *Elsinoë fawcetti* BITANCOURT & JENKINS, e *E. australis* BITANCOURT & JENKINS, que causam as verrugoses dos *Citrus*, foram estudados detalhadamente e devemos muitos dos nossos conhecimentos sôbre este grupo aos trabalhos de BITANCOURT e JENKINS. O maior número das espécies do gênero *Elsinoë* e sua forma conidiana *Sphaceloma* foram assinaladas nos paizes latino-americanos, particularmente no Brasil. Diversas espécies foram assinaladas no Extremo Oriente, particularmente em Java (de onde foi descrito pela primeira vez o tipo do gênero *Elsinoë*), China (JENKINS & CHEO, 1941), Japão (KUROSAWA, 1935, 1939 e SAWADA, 1931) e Ceilão (BITANCOURT & JENKINS, 1939).

Na India, porém, até o presente, somente o estagio conidiano de *Elsinoë fawcetti* era conhecido, coligido que foi em 1867 em Bengala, embora a identificação do patógeno seja devida a JENKINS e FAWCETT (1933) que observaram a forma *Sphaceloma* em material de herbario de *Citrus medica*, depositado no herbario do Arnold Arboretum. JENKINS (1936) também assinala o mesmo fungo sôbre os frutos de *Hesperethusa crenulata*, parente distante do grupo dos *Citrus*, colhidos também em Bengala. Recentemente, porém, o autor descreveu quatro novas espécies de *Sphaceloma* (THIRUMALACHAR, 1946) e uma nova espécie de *Elsinoë* (THIRUMALACHAR, 1946 a) em Misore, um dos Estados do Sul da India. Novas coleções de *Sphaceloma* sôbre varios hospedeiros foram feitas e estudadas pelo autor e o fim do presente trabalho é relatar as suas observações deste material.

---

(1) Recebido para publicação em 2 de Maio de 1946.

(2) Parte do presente trabalho foi feita sendo o autor "research fellow" da Universidade de Misore.

As observações do autor são restritas a Misore, ou seja uma parte do sul da India, e portanto êle não pode pretender conhecer a distribuição ou ocorrência de qualquer outra espécie de *Elsinoë* ou *Sphaceloma* em tão vasto subcontinente como seja a India.

(1) *Elsinoë Bitancourtiana* THIRUMALACHAR (Mycologia, vol. 38, 1946).

Produz numerosas manchas nas fôlhas, peciolos e hastes tenras, esparsas, a maioria epifilas, tornando-se maiores e confluentes, circulares a irregulares, com 3-5 mm de diâmetro, ligeiramente salientes, porém sem nunca mostrar hipertrofia. Ascomas epifilos intraepidérmicos, de côr preta como azeviche, devido ao epitécio formado por hifas pretas e pelas células do hospedeiro; ascos em duas ou tres camadas, hialinos, de paredes finas, imersos no estroma, ovalados ou esféricos, 38-55 x 30-40 μ, contendo 8 esporos; ascosporos elipsoidais, mais largos no ápice que na base, de paredes finas, munidos de 3 septos quando novos, tornando-se depois muriformes devido à formação de paredes longitudinais, medindo 25-31 x 13-15 μ. As manchas da forma *Sphaceloma* são anfígenas, de côr parda amarelada, não hipertrofiadas, errumpentes e pulverulentas. Acérvulos intraepidérmicos, com camadas de paliçadas de conidioforos que rompem a parede externa da epiderme, frequentemente continuos por coalescência; conidióforos de 4 a 6 vezes mais compridos do que largos, cilíndricos, pontudos no ápice, até 12 μ de comprimento, formando acrogenicamente uma sucessão de conidias hialinas; conidias ovaladas ou esféricas, de paredes finas, medindo 7,5 x 4-5 μ.

Sôbre fôlhas de *Scutia myrtina* DALZ. (Ramnaceas), leg. M. J. THIRUMALACHAR, Nandi Hills, 16-11-1944, Burudalbore, 27-4-1945, Yashavantapur, Bangalore, 15-1-1946.

Elsinoë Bitancourtiana é a única espécie até hoje conhecida na India na sua forma perfeita, pois todas as outras espécies são sómente conhecidas na forma *Sphaceloma*. Pelo tipo de sintomas que produz e pela presença de um epitécio bem desenvolvido, *E. Bitancourtiana* distingue-se de *E. Hansfordii* JENKINS & BITANCOURT, assinalado em Uganda, Africa (JENKINS & BITANCOURT, 1942) no mesmo hospedeiro, ou seja *Scutia myrtina*, e baseado no material coligido pelo Dr. C. G. HANSFORD.

O fungo foi isolado em cultura pura transferindo-se aseptica-mente alguns ascosporos para um meio de batata-dextrose-agar. Produz crostas gomosas de côr branca acinzentada. Numa descrição anterior, desta espécie, o autor mencionou que não tinham sido obser-

vadas microconidias. Estas foram agora vistas em grande número, forrando a margem dos ascomas, na superficie interna, e também enchendo as células do hospedeiro.

(2) *Sphaceloma Oleanderi* THIRUMALACHAR (Trans. Brit. Myc. Soc., 1946).

Manchas das fôlhas irregulares ou arredondadas, densamente agrupadas, de 1-4 mm de diâmetro, distribuidas em toda a superficie das fôlhas, esbranquiçadas, com margem preta, ligeiramente elevadas e de superficie irregular devido às massas punctiformes das frutificações. Acérvulos intraepidérmicos, formados na primeira, segunda, ou terceira camada de epiderme, anfígenos, frequentemente tornando-se coalescentes, de 140-200 μ de diâmetro e 60-85 μ de espessura; base estromática bem desenvolvida em varias camadas de células, conidióforos curtos, conidias desenvolvidas acrogenicamente, hialinas, de paredes finas, medindo 5-6,5 x 1,2-2,5 μ.

Sôbre fôlhas de *Nerium Oleander* L. (Apocinaceas), leg. H. C. GOVINDU, Kemmangundi, Estado de Misore, 10-10-1945.

A "espirradeira", *Nerium Oleander*, é cultivada como arbusto ornamental nos jardins e tem flores vistosas. A infecção mostra-se muito grave e causa forte desfoliação dos rebentos. As lesões causadas pelo fungo começam por pequenas pintas e gradativamente estendem-se à toda a superficie da fôlha. A doença até o presente somente foi notada na região de Kemmangundi, numas colinas de Misore e a sua distribuição em outras partes não é conhecida.

(3) *Sphaceloma Terminaliae* BITANCOURT. (Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 8:197-199, 1937).

Manchas das fôlhas, numerosas, de 1-5 mm de diâmetro, pardacentas-pretas, ligeiramente pulvinadas e com aspecto de pústula. Acérvulos intraepidérmicos, epifilos, pequeninos, errumpentes e mostrando-se como pontinhos brancos devido à acumulação das conidias, de 100-170 μ de diâmetro e 80-110 μ de espessura; conidióforos juntados em paliçada, formando grupos compactos, produzindo acrogenicamente numerosas conidias hialinas; conidias maduras unicelulares, hialinas, de paredes finas, medindo 11-17 x 4-6 μ.

Sôbre fôlhas de *Terminalia bellerica* ROXB., (Combretaceas) leg. M. J. THIRUMALACHAR, Nandi Hills, Misore, 16-12-1945.

Sphaceloma Terminaliae foi primeiramente descrito por BITANCOURT como parasita das fôlhas e frutas de *Terminalia Catappa* L. no Estado de São Paulo, Brasil, e não foi, até o presente, assina-

lado em qualquer outra espécie de hospedeiro. No curso de colheitas de fungos perto de Nandi Hills, o autor observou um *Sphaceloma* sôbre *T. bellerica*, o qual apresentava estreita semelhança e de fato era idêntico a *Sphaceloma Terminaliae* descrito por BITANCOURT. Os tipos de sintomas produzidos no hospedeiro e as medidas dos acérvulos e conidias são semelhantes nos dois casos. As conidias são, na maioria, unicelulares, hialinas, porém, como já assinalou também BITANCOURT, raramente elas apresentam um septo. *Sphaceloma Terminaliae* é aqui, portanto, não sómente assinalado pela primeira vez na India, como também sôbre uma nova espécie de hospedeiro.

(4) *Sphaceloma Santali* THIRUMALACHAR (Trans. Brit. Myc. Soc., 1946).

Produz areas acinzentadas na face superior da fôlha, às vezes tintas de preto purpureo e apresentando-se como discolorações pardas, até pretas. Acérvulos anfigenos, porém principalmente epifilos, intraepidérmicos, com 43-60 x 60-140 μ, não coalescentes; conidióforos, de 43-60 μ de comprimento, produzidos em tufos e desenvolvidos a partir de um estroma escasso ou células hifais que em seguida se tornam indistinguiveis; conidias produzidas acrogénicamente, hialinas, ovaladas - elípticas, medindo 5-9 x 2,5-3 μ.

Sôbre fôlhas de *Santalum album* L. (Santalaceas) leg. M. J. THIRUMALACHAR, Lakkavalli, Estado de Misore, 14-10-1945.

A árvore do sândalo é bem estimada pelo seu óleo essencial e é de grande importância econômica em Misore onde proporciona lucros de varios "lakhs" de rupias por ano (um dolar americano é equivalente a 3½ rupias e portanto a rupia vale aproximadamente 6 cruzeiros). Associada com uma espécie de *Oidium* e com o ascomiceto parasita epifilo *Asterina congesta* CKE., a espécie de *Sphaceloma* observada sôbre *Santalum* produz algum dano às árvores porque causa a defoliação prematura dos ramos. O autor não procurou averiguar a extensão da distribuição da doença nas florestas de Misore e por esse motivo não é possivel no momento avaliar as perdas atualmente sofridas.

(5) *Sphaceloma Osyridis* THIRUMALACHAR (Trans. Brit. Myc. Soc., 1946).

Manchas pequeninas, em circulos regulares, concêntricos, apresentando-se como muito pequenas excavações. Acérvulos intraepidermicos, com camada de conidióforos em paliçada, desenvolvidos sôbre um estroma basal; conidióforos clavados ou cilíndricos, pontudos no

ápice, produzindo acrogenicamente conidias hialinas; conidias ovaladas ou esféricas, unicelulares, hialinas, com paredes finas e medindo 3 x 2,5 μ.

Sôbre fôlhas de *Osyris Wightiana* WALL. (Santalaceas), leg. M. J. THIRUMALACHAR, Nandi Hills, Est. de Misore, 19-2-1944.

Osyris Wightiana, um membro das Santalaceas, é um parasita parcial das raizes que prospera nos distritos de colinas secas. O cerne desta planta é de côr avermelhada e possue um ligeiro cheiro de pau sândalo. É por este motivo utilisado para falsificar o sândalo. As manchas das fôlhas mostram-se dispostas em bem definidos círculos concêntricos com simetria quase perfeitamente geométrica. Os acérvulos são intraepidérmicos, e os conidióforos grupados de modo muito compacto. As células do hospedeiro, por baixo dos acérvulos, tornam-se côr de laranja e com aparência de cancro.

(6) Doença de *Spondias mangifera* WILLD.

Manchas dos foliolos epifilas, aparecendo ordinariamente nas duas faces, com 3-6 mm de diâmetro, frequentemente maiores devido à coalescência das manchas entre si; manchas das frutas, numerosas, esparsas, com 2-4 mm de diâmetro, com epiderme rompida, e mostrando-se como depressões pardas acinzentadas. Acérvulos intraepidérmicos, de 150-250 μ de diâmetro e 50-80 μ de espessura, compostos de conidióforos de côr amarela pardacenta, desenvolvidos sôbre uma base pseudo-parenquimática, e que consistem em células subglobosas, aproximadamente de 9 μ de comprimento, formando acrogénicamente numerosas conidias; conidias maduras ovalado - elipsoidais, hialinas, de paredes finas, medindo 10-14 x 4-5 μ.

Sôbre fôlhas e frutas de *Spondias mangifera* WILLD., (Anacardiaceas) leg. M. J. THIRUMALACHAR, Bangalore, 10-1-1946 (figs. 1 a 4).

Uma doença causada por um *Sphaceloma,* verificada em *Spondias dulcis* e *S. purpurea* na América, foi descrita por BITANCOURT e JENKINS (1942) e o fungo designado por *Sphaceloma Spondiadis* BITANCOURT & JENKINS. O fungo forma lesões nas fôlhas e manchas nas frutas, com acérvulos medindo 30-150 μ de diâmetro, e até 60 μ de espessura. Nenhuma conidia foi observada nos especimens por eles examinados, mas o fungo foi isolado em cultura pura a partir das frutificações em *Spondias dulcis.* O fungo observado pelo autor é também um *Sphaceloma,* atacando uma nova espécie hospedeira do gênero *Spondias,* i. e. *S. mangifera.* As frutas imaturas desta planta são utilizadas para a preparação de "pickles", pelo que ela apresenta

alguma importância econômica. As frutificações de *Sphaceloma* observadas pelo autor são muito maiores que as descritas para *Sphaceloma Spondiadis*. Por exemplo, os acérvulos medem 150 a 250 μ no material coligido pelo autor, em comparação com 30 a 150 μ observados por BITANCOURT e JENKINS. Além disto nenhuma conidia foi observada para *S. Spondiadis* de modo a permitir futuros estudos comparativos.

Nestes casos, em que mais de um tipo de frutificações de *Sphaceloma* são encontradas no mesmo gênero de hospedeiro, caracteres morfológicos e culturais devem ser tomados em consideração na distinção entre espécies. Por exemplo, no caso da verrugose dos *Citrus*, antes da descoberta das formas *Elsinoë*, *Sphaceloma Fawcetti* e *S. australis* eram distinguidos na base de caracteres morfológicos e culturais. O maior tamanho dos acérvulos no *Sphaceloma* sôbre *Spondias mangifera* em comparação com *Sphaceloma Spondiadis* indica que o primeiro poderia representar uma espécie ainda não descrita. Na ausência, porém, de qualquer material tipo ou cultura de *S. Spondiadis*, autênticos, para comparação, o autor propõe tratar a espécie de *Sphaceloma* em estudo como *S. Spondiadis* BITANCOURT & JENKINS.

(7) *Sphaceloma Curcumae* THIRUMALACHAR (Trans. Brit. Myc. Soc., 1946).

Acérvulos intraepidérmicos, epifilos, pequeninos, punctiformes, de 31-50 μ de diâmetro, pardos amarelados, compostos de células pseudo-parenquimatosas compactas, com conidióforos grupados em paliçada, mostrando coalescência lateral. Conidias maduras não foram observadas. Microconidias numerosas, enchendo as células do hospedeiro.

Sôbre *Curcuma* sp. (Zingiberaceas), Shankar Shola, Kemmangundi, Misore, 9-10-1945.

As plantas selvagens de "açafrão da India" ("*turmeric*") estão bem distribuidas nas florestas de Misore. Seus rizomas são usados localmente como fonte adicional de amido. Nas infecções foliares, causadas por *Sphaceloma Curcumae*, tornam-se visiveis a principio pequenas manchas circulares, amarelas pardacentas. Estas se expandem gradativamente de forma a produzir finalmente manchas circulares a ovaladas, que chegam a ter 4 mm de diâmetro. Acham-se principalmente restritas à face superior da fôlha. Os acérvulos são comparativamente pequeninos e punctiformes e situados numa posição

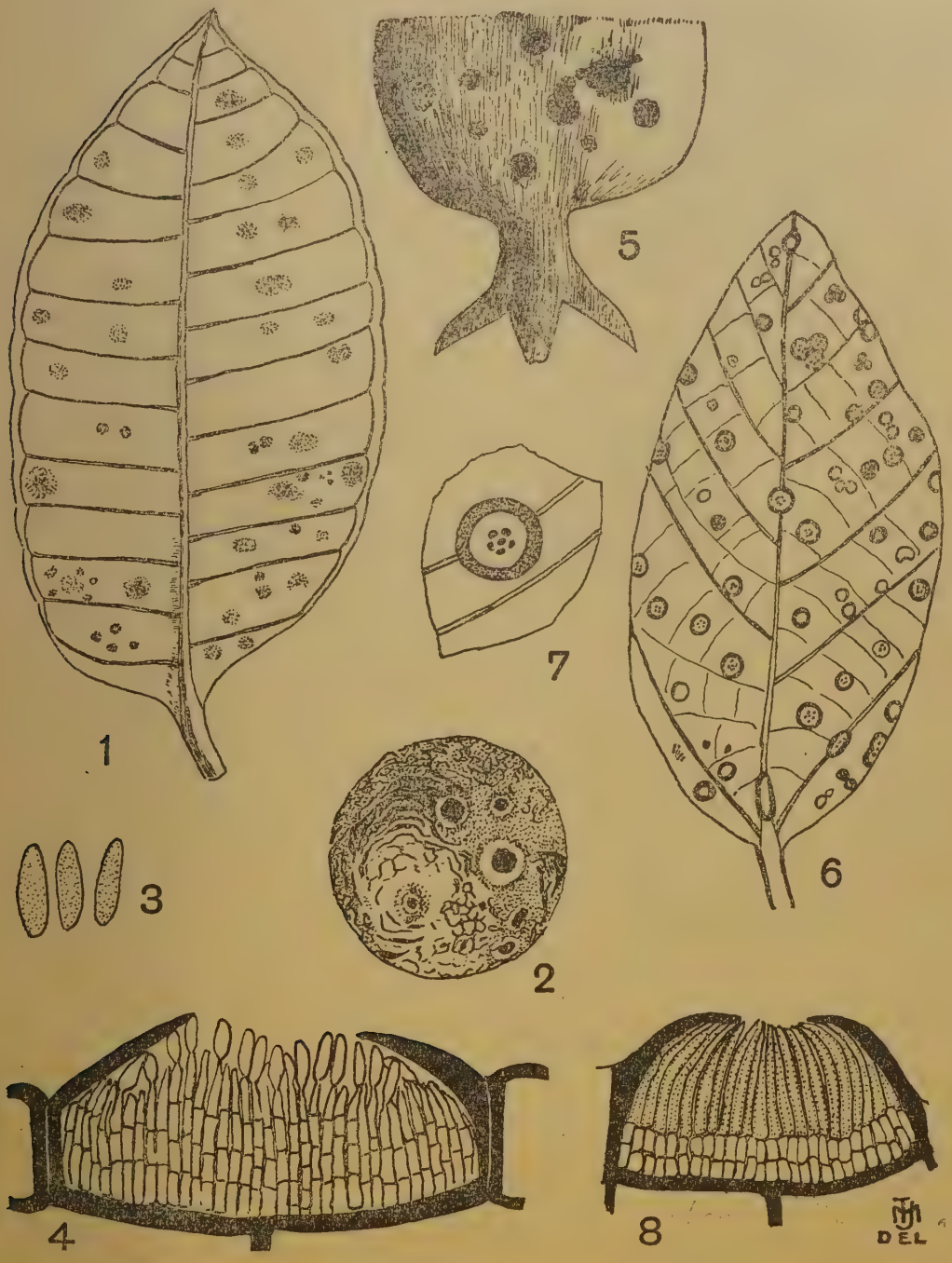


Fig. 1 - Foliolo infetado de *Spondias mangifera*. Tamanho natural. Fig. 2 - Fruto com verrugose, do mesmo. T. n. Fig. 3 - Conidias de *Sphaceloma Spondiadis* (?) × 1000. Fig. 4 - Frutificação do mesmo *Sphaceloma*. × 500. Fig. 5 - Manchinhas das frutas de romanzeira produzidas por *Sphaceloma Punicae*. T. n. Fig. 6 - Fôlha de *Ficus glomerata* com manchas de *Sphaceloma Fici*. T. n. Fig. 7 - Vista aumentada de uma das manchas da fig. 6, × 3. Fig. 8 - Frutificações de *Sphaceloma Fici* × 500.

subcuticular. Embora conidias maduras não tenham sido notadas, numerosas microconidias que enchem os acérvulos e as células do hospedeiro foram observadas.

(8) *Elsinoë Fawcetti* BITANCOURT & JENKINS (Phytopathology, 26:393-396, 1936) = *Sphaceloma Fawcetti* JENKINS.

A forma conidiana do fungo da verrugose da laranjeira azeda, *Elsinoë Fawcetti*, foi coligida sôbre *Citrus grandis* OSBECK perto de Thirthahalli, Misore. Lesões verrugosas novas foram colhidas em frutas novas onde frequentemente formam areas crateriformes de verruguinhas. As colheitas foram feitas uma unica vez, no mês de Abril. Secções atravez da casca de frutas novas mostraram as lesões características de *Sphaceloma*, mas nenhuma conidia madura foi observada. Conforme já mencionamos, *Sphaceloma Fawcetti* foi assinalado, quanto á India, por JENKINS e FAWCETT (1933). KAR e SHAW (1943) também descreveram o fungo sôbre *Citrus grandis* e sugeriram medidas de controle da doença.

(9) *Sphaceloma Punicae* BITANCOURT & JENKINS. Proc. Amer. Sci. Congr. 1940, 3:149-172. = *Hadrotrichum Populi* MONTEM. *nec* SACC.

Manchas das frutas, numerosas, esparsas, de cor purpurea preta, ligeiramente salientes, punctiformes, de 2-6 mm de diâmetro; acérvulos intraepidérmicos, de 30-100 μ de diâmetro, com estromas pseudo-parenquimáticos de 15-40 μ de espessura, tornando-se coalescentes uns com os outros e formando um estroma continuo; conidióforos agrupados em paliçada compacta, 10-15 x 3-5 μ ; as conidias não foram observadas mas as microconidias estão presentes em abundância.

Sôbre frutas de *Punica granatum* L., (Punicaceas) leg. M. J. THIRUMALACHAR, 15-1-1946, Bangalore, India.

A doença das manchas das frutas da romanzeira (Fig. 5) é extensamente distribuida em Misore e o respetivo material pode ser coligido em abundância durante os mêses de Novembro e Março. As manchas são pequeninas e de cor purpurea quase preta a principio, estendendo-se gradativamente em areas pulvinadas que se tornam confluentes umas com as outras. Há uma desfiguração consideravel das frutas, e particularmente no caso das frutas novas a infecção provoca o endurecimento da casca externa e mesmo o rompimento dela.

A doença de *Punica granatum* produzida por este *Sphaceloma* foi primeiramente descrita da Argentina e do Brasil por BITANCOURT

e JENKINS (1942). MONTEMARTINI (1920) descreveu uma doença caracterisada pela formação de manchas nas frutas de romanzeira em Pavia, na Italia, atribuindo-a a *Hadrotrichum Populi*. BITANCOURT e JENKINS, entretanto, mostraram que deveria tratar-se de *S. Punicae*. As conidias não foram observadas nem no material tipo nem no coligido pelo autor em Bangalore.

A introdução da doença e sua disseminação a partir de um ponto focal seria, si fosse investigada, de um grande interesse. O gênero *Punica*, com suas duas espécies, é tipicamente nativo da Asia, de onde foi introduzido em outros paizes. A doença da romanzeira produzida por *S. punicae* foi assinalada na América do Sul e indiretamente traçada até a Italia por BITANCOURT e JENKINS. Um levantamento detalhado desta doença deveria ser feito nas romanzeiras que crescem nas diversas regiões da India, particularmente nas partes do Noroeste, para que seja possivel formular qualquer opinião relativa ao lugar de origem e disseminação da doença nas diferentes partes do mundo.

(10) Uma nova espécie de *Sphaceloma* sôbre *Ficus glomerata* ROXB.

Sphaceloma Fici THIRUMALACHAR, sp. nov.

Manchas das fôlhas, numerosas, redondas ou ligeiramente irregulares, de 2-4 mm de diâmetro, ocorrendo em qualquer parte da fôlha, anfígenas, às vezes marginais, de margem parda escura. Acérvulos epifilos, numerosos, errumpentes, intraepidérmicos, redondos ou alongados, de 28-144 × 26-34 μ; conidióforos amarelos pálidos, até 15 × 2,4 μ. As conidias não foram observadas.

Maculae in foliis orbiculares vel subirregulares, numerosaeve, laminam conspersae, 2-4 mm diam. plerumque fusco marginatae. Acervulis epiphyllis, numerosis, erumpentibus, intraepidermalibus, rotundis vel elongatis, 28-144 × 26-34 μ, palis conidiophororum flavidulis, 15 × 2,4 μ; conidia alia non visa.

Sôbre fôlhas de *Ficus glomerata* ROXB., (Moraceas), Kemmangundi, Misore, leg. MOODLI, 29-12-1945.

Tipo depositado no Herbario criptogámico das Indias Orientais, New Delhi, no Imperial Mycological Institute, Kew, e no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (Fig. 6 a 8).

O exame de manchas das fôlhas de *Ficus glomerata* ROXB. coligidas perto de Kemmangundi, Misore, revelou a presença desta espécie de *Sphaceloma*. As manchas aparecem, no inicio, como pintas pequeninas que se tornam gradativamente circulares ou ligeiramente irregulares, medindo 2 a 4 mm de diâmetro. Tornam-se conspicuas pela presença de uma margem preta pardacenta (fig. 7) que poste-

riormente mostra uma parte central esbranquiçada, papiracea. Na superficie superior da mancha observa-se o desenvolvimento das frutificações de *Sphaceloma* na forma de pequeninas pintas pretas. Nas nervuras central e secundarias as manchas acham-se igualmente presentes em número apreciavel, estendendo-se em areas alongadas.

O desenvolvimento dos acérvulos é intraepidérmico, formados que são pelo agrupamento de hifas no interior da camada epidermal superior (fig. 8). Os acérvulos, a principio, são pequeninos e punctiformes, tornando-se grandes e continuos em consequência da coalescência lateral dos acérvulos visinhos. Os conidióforos, que são agrupados de um modo compacto, formando uma paliçada, estão desenvolvidos sôbre uma base estromática, composta de duas ou três camadas de células hifais. A parede superior da epiderme se rompe devido à pressão dos conidióforos. Conidias maduras ainda não foram observadas.

Uma revisão da literatura indica que uma espécie de *Sphaceloma* nas fôlhas de *Ficus religiosa*, em Formosa, foi assinalada por KUROSAWA (1935). Ao que conheça o autor, a espécie não foi nomeada e nenhum caracter diagnóstico foi publicado. A espécie de *Sphaceloma* foi coligida, em Misore, no mesmo gênero de hospedeiro, porém em diferente especie. A coleção de *Sphaceloma* descrita pelo Dr. KUROSAWA não é acessivel para comparação, e portanto não é possivel afirmar si os dois fungos são ou não diferentes. Na ausência de alguma espécie definidamente nomeada de *Sphaceloma* sôbre *Ficus* o autor propõe chamar a nova espécie *Sphaceloma Fici* para designar o fungo da mancha das fôlhas de *Ficus glomerata* de Misore.

O autor deseja exprimir seus agradecimentos ao Dr. A. A. BITANCOURT, Diretor de Pesquisas de Biologia Vegetal, Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, pela sua gentileza de ler o manuscrito e verte-lo para o portuguez, e ao Dr. L. N. RAO, Professor de Botânica, Universidade de Misore, pelo seu bondoso encorajamento.

RECORDS OF "ELSINOË" AND "SPHACELOMA" DISEASES IN MYSORE (SOUTH INDIA)

Abstract

In the present paper accounts of nine species of Sphaceloma and one species of Elsinoë have been recorded for Mysore, South India, including Sphaceloma Fawcetti

which was the only species known for India till now. Elsinoë Bitancourtiana is the only form known in its perfect stage, the rest being known in their Sphaceloma stages.

Sphaceloma Punicae, S. Spondiadis, and S. Terminaliae have now been recorded for India. The occurrence of S. Punicae would be of interest if the distribution of the disease in India were to be investigated, since, it would throw light on the place of origin and distribution of the disease.

Sphaceloma Oleanderi on oleander, S. Santali on sandal and S. Curcumae on wild turmerics are found to cause some damage to their respective hosts. Sphaceloma Fici has been described as a new species on Ficus glomerata ROXB. *parasitising the leaves and developing circular lesion spots.*

BIBLIOGRAFIA

BITANCOURT, A. A. — 1937 — Novas especies de Sphaceloma sobre Terminalia e Genipa. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 8: 197-199.

BITANCOURT, A. A. & A. E. JENKINS — 1939 — "Elsinoë Theae" n. sp., Agente da verrugose do chá. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 10: 193-198.

BITANCOURT, A. A. & A. E. JENKINS — 1942 — New discoveries of Myriangiales in the Americas. *Proc. Amer. Sci Congr.* 8 th. 1940, 3: 149-172.

JENKINS, A. E. — 1933 — Application of the terms "anthracnose" and "scab" to the diseases caused by Sphaceloma and Gloeosporium. *Phytopathology*, 23: 389-395.

JENKINS, A. E. — 1936 — A Sphaceloma on fruit of Hesperethusa crenulata a remote citrus relative from India. *Phytopathology*, 26: 71-73.

JENKINS, A. E. & A. A. BITANCOURT — 1942 — Elsinoë in Uganda. Mycologia, 34: 318-321.

JENKINS, A. E. & C. C. CHEO — 1941 — Descriptions of Elsinoë dolichi, n. sp. and Sphaceloma ricini, n. sp. *J. Wash. Acad. Sc.*, 31: 415-417.

JENKINS, A. E. & H. S. FAWCETT — 1933 — Records of Citrus scab from Herbarium specimens of the genus Citrus in England and the United States. *Phytopathology*, 23: 475-482.

KAR, P. C. & J. C. SHAW — 1943 — Controlling scab of pumelo, Citrus grandis Osbeck (C. decumana L.). *Sci. & Culture*, 8: 422-423.

KUROSAWA, E. — 1935 — On the spore type of Citrus scab (em Japonez). *Ann. Path. Soc. Japan*, 5: 175-178.

KUROSAWA, E. — 1939 — *id.* 9: 131-132 (citado por Bitancourt & Jenkins, 1942).

MONTEMARTINI, L. — 1920 — Alcune malattie nuove e rare osservata nel Laboratorio di Patologia Vegetale di Milano. *Riv. Patol. Veg.*, 10: 119-125 (o original não foi visto).

SAWADA, K. — 1931 — Descriptive catalog of the Formosan Fungi V. *Rep. dept. Agr. Res. Inst. Formosa,* 51: 105-106. (citado por Bitancourt & Jenkins, 1942).

THIRUMALACHAR, M. J. — 1946 — Mycological Notes I. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* (no prelo).

THIRUMALACHAR, M. J. — 1946a — An undescribed species of *Elsinoë* from Mysore. *Mycologia,* 38: 220-225.

Vol. 17 — Art. 5 Setembro de 1946

DUAS VERRUGOSES DO CHÁ, CAUSADAS POR "ELSINOË", E SUA DISTRIBUIÇÃO

POR

Anna E. Jenkins e A. A. Bitancourt

Do Bureau of Plant Industry, Soils and Agricultural Engineering, U. S. Department of Agriculture e do Instituto Biológico de S. Paulo

Com a estampa 3

Há duas descrições de doenças do chá do tipo das verrugoses no Oriente. A primeira, feita em Ceilão por PETCH (1923, p. 43-44, estampa 1, 7 e 8, em cores) tem por título *"scabbed leaves"* (1). Devido a ser pouco abundante e inconspícuo o respectivo patógeno, a causa da doença não fôra determinada a principio. Em 1939 os autores puderam encontrar ascomas de *Elsinoë* (JENKINS & BITANCOURT, 1941) num especimen coligido pelo Dr. PETCH em Ceilão em 1917. Isso confirmou a opinião deles de que um mosqueado das fôlhas de chá causado por *Elsinoë* e então recentemente descoberto na Cantareira, perto de São Paulo, Brasil, era essencialmente o mesmo que a doença de Ceilão. Dest'arte, ao descrever *E. theae*, assinalaram sua ocorrência no Brasil e em Ceilão (BITANCOURT e JENKINS, 1939), como agente da verrugose do chá. Posteriormente foram conseguidos especimens de outras procedências, o que estendeu a distribuição geográfica da doença, a qual será agora designada como "verrugose mosqueada" (*"mottle scab"*).

Em 1939, em correspondência com o Dr. S. F. ASHBY, então Diretor do Imperial Mycological Institute, Kew, Inglaterra, soube-se que o Sr. C. G. HANSFORD, micologista do Departamento de Agricultura, Kampala, Uganda, Africa, que então trabalhava naquele Instituto, observara a existência da verrugose do chá em Uganda, mas não tinha encontrado fungo algum em associação com ela. Em seguida os autores corresponderam-se com o Sr. HANSFORD e souberam que ele assinalara em duas ocasiões o que designara por *"scabbed leaf"* do chá em Uganda (HANSFORD, 1937, p. 498 e 1940, p. 443). Nestes trabalhos ele descreve claramente a "verrugose mosqueada", como também o faz SMEE (1927) em semelhante relatório para Nyasaland. Mais recentemente HANSFORD (1943) assinalou *Elsinoë theae* em Uganda e enviou aos autores especimens caracteristicos da doença.

(1) Em publicação anterior (BITANCOURT & JENKINS, 1939), os autores transcreveram, no original em inglês, a descrição de Petch.

O Dr. ASHBY também comunicou que o chá estava sendo cultivado na parte sul do Territorio de Tanganyika e que o Dr. G. B. WALLACE poderia provavelmente encontrar a verrugose naquelas paragens. A pedido dos autores o Dr. WALLACE enviou os tres especimens seguintes: Usambará Mountains, Agosto de 1940, G. B. WALLACE; East Usambará Mountains, Setembro de 1940, H. H. STOREY; West Usambará Mountains, Setembro de 1940, G. B. WALLACE. Estes especimens apresentam lesões típicas de verrugose mosqueada, com ascomas de *Elsinoë*, os quais, vistos em secção, mostram-se intraepidérmicos, tornando-se errumpentes em seguida. São pulvinados, até quase hemisféricos, e cobertos de um epitécio escuro, constituido de uma a duas camadas de células. Medem 65-150 μ de diâmetro por 20-32 μ de espessura. Em um caso em que o estroma se desenvolveu para baixo, como um cone invertido, a frutificação alcança a espessura de 75 μ na parte central. Estas medidas correspondem satisfatoriamente ás dos ascomas de *E. theae*, que, no especimen tipo da Cantareira têm 100-200 x 30-50 μ (e não 200-300 x 15-18 μ como foi erradamente mencionado na descrição original).

Na India, CHAUDHURI, KAPUR e BHATIA (1937, p. 570, fig. 7, em cores) descreveram e ilustraram o que designam por "*scabbing of leaves*" do chá, em Kangra Valley, Punjab; também essa descrição corresponde bem às "*scabbed leaves*" de PETCH. Por gentileza do Dr. S. P. WILTSHIRE, atual diretor do Imperial Mycological Institute, foi possivel obter um especimen representativo da doença descrita pelos citados autores, coligido pelo Sr. BHATIA em Palampur, Kangra District, Punjab, em 30 de Dezembro de 1931. A verrugose característica é semelhante à que foi descrita pelos autores indianos e por PETCH.

A outra doença do chá assinalada no Oriente é o "*white scab*" ou "verrugose branca" de KUROSAWA (1939) cujo patógeno ele descreveu como *Sphaceloma theae*. Esta doença difere da verrugose mosqueada pelas manchas, que são brancas e caracteristicamente circulares (2). Estes caracteres, assim como certas diferenças nos

(2) A descrição dos sintomas da doença e de seu patógeno, conforme a traduzio para nós, do japonês para o inglês, J. G. YOSHIOKA, é a seguinte:

Symptoms. Young leaves and young twigs are affected. In the leaf both the surfaces develop dark purplish-brown minute spots scattered all over and in clusters. These spots after swelling up slightly form a depression in the center and then turn light brown and finally change into grey, greyish white or white, and expand into a circle with the diameter 1-3 mm. The periphery is surrounded by a dark purplish-brown rim and clearly demarcated. The spots on the under surface of the leaf differ depending upon the age of the leaf. On a matured hardened leaf no spot appears, but on a young tender leaf yellowish-green raised spots develop and some of the spots contain a shallow central depression which looks like a dark purplish-brown scabby stain. These stains expand into light brown or grey spots surrounded by a dark brown rim. Neighboring spots often coalesce into irregular patches which feel rough to the touch.

patógenos, levam-nos a considerar as duas doenças como sendo distintas, pelo menos até que estudos mais demorados e detalhados provem o contrario. Nenhum especimen da verrugose branca do Japão foi conseguido pelos autores, mas o que lhes parece a mesma doença está representado por um especimen de fôlhas de chá manchadas, proveniente de Antigua, Guatemala. Estas fôlhas foram proporcionadas pelo Sr. A. S. MULLER, Diretor da Escola Nacional de Agricultura, Villa Nueva, Guatemala, que as colecionou em 1 de Janeiro de 1940 (Est. 3, *C*.) Nesse especimen a forma conidiana (Est. 3, *F*) está de acordo com a descrição de *Sphaceloma theae* por KUROSAWA. Os ascomas também se encontram em abundancia. Esta forma perfeita de Ascomiceto mostra-se diferente, em alguns aspetos, de *Elsinoë theae*, fato que, associado à diferença tão notavel que apresentam as lesões produzidas pelos dois fungos (comparar na est. 3, *A* e *B*, com *C* e *D*,), justifica considerar-se o fungo de Guatemala como distinto de *E. theae* BITANCOURT & JENKINS.

The vein, petiole and stem show similar pathology and develop blister-like spots or swellings surrounded by a purplish-brown halo. These small circles have a central depression, change to a light brown, and finally develop into greyish white spots. On the stem the spots develop mainly on the upper surface (surface of direct sunlight).

The Causative Fungus. The mycelium at the affected part spreads into the interstices between the cells and presses on the cells causing their disintegration. It is colorless or yellowish-brown, has many septa and frequently assumes a rosary form. The thickness is inconstant and varies from 2 to 5.3 μ. On a culture medium the mycelium grows closely packed on the surface and appears colored in clusters but are colorless individually. A fresh specimen of the mycelium is solidly packed with the contents, which, however, gradually loses its compactness and becomes filled with fat globules. The majority of the threads assume a rosary form and have the diameter of 3.3-10.6 μ. The mycelium grown on a culture medium is slender, curved, many-branched, occasionally septate and 2-3.3 μ in diameter.

Acervuli develop like hills under the cuticle and are 15-52 μ in diameter, neighboring acervuli often becoming confluent reaching the diameter of 130 μ or larger. They are light yellowish-brown and occasionally form multiple sporogenous layers. The component cells are 3.9-5.3 μ in diameter. On the upper surface of the acervuli are rows of conical conidiophores which are colored the same as the sporogenous layers when in clusters, but are colorless individually. The conidiophores are single-celled, smooth, and 5.3-10.6 × 2.6-5.3 μ in size. Those which are taken from diseased tissues or grown on cultures are often septate and 5.3-15.9 × 2.6-5.9 μ in size.

Conidia develop singly from the tip of the conidiophores tawara-shaped (ellipsoid) or elongated-elliptical shape, single-celled, smooth, having a homogenous content and two eye-spots at the two opposite ends. The size is 4.6-7.9 × 2.0-4.6 μ, most commonly 6.0 × 3.8 μ. Conidia from a cultured fungus measure 3.9-9.9 × 2.6-4.6 μ, most commonly 6.0-7.3 × 3.3 μ. When kept immersed in water for some time, the conidia swell up and form one septum occasionally. Conidia germinate like yeasts and may regenerate spores or develop a short and curved penetration tube of inconstant caliber.

Host Plants:

Parasitizes young leaves and young twigs of tea (*Thea sinensis* L.).

Collected Specimens:

Place	Date	Collector
Tsubaki-mura, Chikuba, Ibaraki Prefecture	Sept. 1933	EIICHI KUROSAWA
Kanatani, Shizuoka Prefecture	Sept. 1934	TAKASHI SHIMURA
Honmoku, Yokohama, Kanagawa Prefecture	May 1936	EIICHI KUROSAWA

Distribution:

Ibaraki Prefecture, Kanagawa Prefecture, Shizuoka Prefecture.

Elsinoë leucospila BITANCOURT & JENKINS, sp. nov.
Sin. *Sphaceloma theae* KUROSAWA

Manchas epifilas, esparsas, às vezes confluentes, redondas ou um tanto irregulares, principalmente quando situadas sôbre a nervura principal, onde não raro são mais numerosas, salientes, com a parte central de côr branca, ou branca suja, devido ao esvasiamento das celulas dos tecidos superficiais da fôlha, que são lisos ou levemente enrugados, ou que apresentam fissuras, ou ainda que se desagregam irregularmente, descobrindo os tecidos subjacentes, igualmente de celulas vasias e de coloração branca. Estes tecidos superficiais brancos contêm na periferia das manchas as gonidias da alga *Cephaleuros virescens* KUNZ, que lhes emprestam uma coloração esverdeada ou verde palida amarelada (*glass green*, [3] a *chartreuse yellow*, ou mais pálido). A margem da mancha, em torno da parte central saliente, é constituida de uma estreita linha de 0,3 mm de largura, de côr marron (*natal brown*), mais escura na direção do centro da mancha. Na parte central da zona branca das manchas ha numerosos pontinhos pretos, mais ou menos salientes, às vezes dispostos em circulos concêntricos constituidos pelas frutificações, perfeita e imperfeita, do fungo causal, ou por frutificações de liquenes, e na parte periférica da mesma zona os esporangióforos de *Cephaleuros virescens*, às vezes dispostos em um ou mais aneis concêntricos.

Ascomas fortemente salientes, estabelecidos sôbre as celulas em paliçada do mesofilo superior do hospedeiro, que apresentam um espessamento característico da parede periclina superior, e estão repletas de goma de ferida escura. Medem 50 a 100 μ de diametro, por 50 a 80 μ de altura, são constituidos por um pseudoparênquima hialino, e cobertos de um epitecio feito de elementos celulares de paredes escuras. Acham-se repletos de ascos globosos, medindo aproximadamente 20-25 μ de diâmetro e que contêm até 8 ascosporos hialinos, munidos de 2 a 3 septos, às vezes com septos longitudinais nas células medianas, medindo 13-16 x 5-7 μ.

Forma imperfeita (*Sphaceloma*) constituida por acérvulos ou esporodoquios errumpentes, feitos de uma paliçada de conidióforos intimamente coalescentes, de paredes escuras, medindo cerca de 15 μ de comprimento por 3 μ de largura, geralmente munidos de um septo transversal, assentados sôbre um pseudo-parênquima de paredes escuras, mais claras, até hialinas, nas partes mais profundas. Não foram vistas conidias.

Pela estrutura de seus ascomas, com epitecio bem definido, esta espécie distingue-se de *E. theae*, cujos ascomas formam uma massa de pseudoparênquima homogêneo bem delimitado do hospedeiro e uniformemente escuro, raramente com escurecimento mais acentuado na região externa. Na descrição original (BITANCOURT & JENKINS, 1939) as dimensões dos ascomas de *E. theae* foi dada como sendo 200-300 x 15-18 μ, quando na realidade eles medem de 100 a 200 por 30 a 50 μ. Os ascosporos de *E. theae* são ligeiramente menores do que os da presente especie.

Maculis epiphyllis sparsis, interdum confluentibus, rotundis vel paulo irregularibus, eminentibus, usque 4 mm latis, medio subalbidis et punctulatis, margine brunno cinctis, laevibus vel parce rugosis, interdum fissuratis; Ascomatibus erumpentibus, pulvinatis, 50-100 μ latis et 50-80 μ altis, hyalinis, pseudoparenchymatosis, epithecio fusco. Ascis 8-sporis, globosis, 20-50 μ latis; sporis hyalinis, 2-3 septatis, cellulis mediis plerumque longitudinaliter septatis, 13-16 × 5-7 μ; Acervulis vel spo-

---

[3] As cores são indicadas aproximadamente, em português. A indicação precisa em inglês, e baseada em RIDGWAY (1912).

rodochiis (Sphaceloma) e conidiophoris coalescentibus formatis, fuscis, 15 × 3 μ, vulgo 1-septatis, e pseudoparenchymate fusco erumpentibus. Conidiis non visis. (4)

Especimen tipo: Antigua, Guatemala, 1 Jan. 1940, A. S. MULLER (Mycological Collections, Bureau of Plant Industry 73740; Herbario da Secção de Fitopatologia Instituto Biologico de São Paulo 4141). Outro especimen de Antigua examinado foi colhido em 1 de Dezembro 1941, A. S. MULLER 84.

Nota: Dois outros especimens aparentemente da verrugose branca do chá devem ser assinalados. O primeiro foi colhido em Lake City, Florida, Estados Unidos, em 2 de Abril 1893, por P. H. ROLFS, o segundo em Soledad, Cuba, em Fevereiro de 1922 por W. A. ORTON. Em ambos encontram-se acérvulos que correspondem à forma imperfeita de *Elsinoë leucospila;* acham-se entretanto muito escurecidos pela presença do fungo *Strigula.* Duas localidades do Peru forneceram material semelhante: Tingo Maria e Huanuco. Estes especimens foram enviados em 1944 pelo Sr. B. S. CRANDALL, fitopatologista, Agric. Exp. Sta., Tingo Maria.

TWO SCAB DISEASES OF TEA CAUSED BY "ELSINOË", AND THEIR DISTRIBUTION

Abstract

Specimens and published records assembled show that, altogether, scab of tea, here termed "mottle scab", caused by Elsinoë theae BITANCOURT & JENKINS *is known in Ceylon, Kangra Valley, Punjab, India, Uganda, Tanganyika Territory, Nyasaland, and in the State of São Paulo, Brazil. White scab of tea independently reported from Japan in 1939, by* KUROSAWA, *who described the pathogene as Sphaceloma theae* KUROSAWA, *appears to be distinct from mottle scab. Specimens at hand from Guatemala are identified as white scab. Elsinoë present on this material in perfect and conidial stages is described as a new species, E. leucospila* BITANCOURT & JENKINS *with S. theae* KUROSAWA *given as a synonym.*

BIBLIOGRAFIA

BITANCOURT, A. A. & A. E. JENKINS — 1939 — Elsinoë theae n. sp. agente da verrugose do chá. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 10: 193-198.

CHAUDHURI, H., V. S. KAPUR & L. L. BHATIA — 1937 — Diseases of the tea bush in the Kangra Valley. *Indian Journ. Agr. Sci.*, 7: 565-573.

---

(4) Os autores consignam aqui os seus agradecimentos a D. B. Pickel, que verteu para o latim esta diagnose.

HANSFORD, C. G. — 1937 — Annotated host list of Uganda parasitic fungi and plant diseases — part. II. *East African Agr. Jour.*, 2: 498-504.

HANSFORD, C. G. — 1940 — *Diseases of tea.* In Agriculture in Uganda, by the Staff of the Department of Agriculture Uganda. Edited by J. O. Tothill. p. 442-444. London.

HANSFORD, C. G. — 1943 — Host list of the parasitic fungi of Uganda. *East African Agr. Jour.*, 8: 242-252.

JENKINS, A. E. & A. A. BITANCOURT — 1941 — Revised descriptions of Elsinoë and Sphaceloma. Mycologia, 33: 338-340.

KUROSAWA, E. — 1939 — Sphaceloma theae n. sp. Summaries of phytopathological papers presented at tre meeting of the Phytopathological Society of Japan held in April 1939. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 9: 131-132.

PETCH, T. — 1923 — The diseases of the tea bush. 220 p. London.

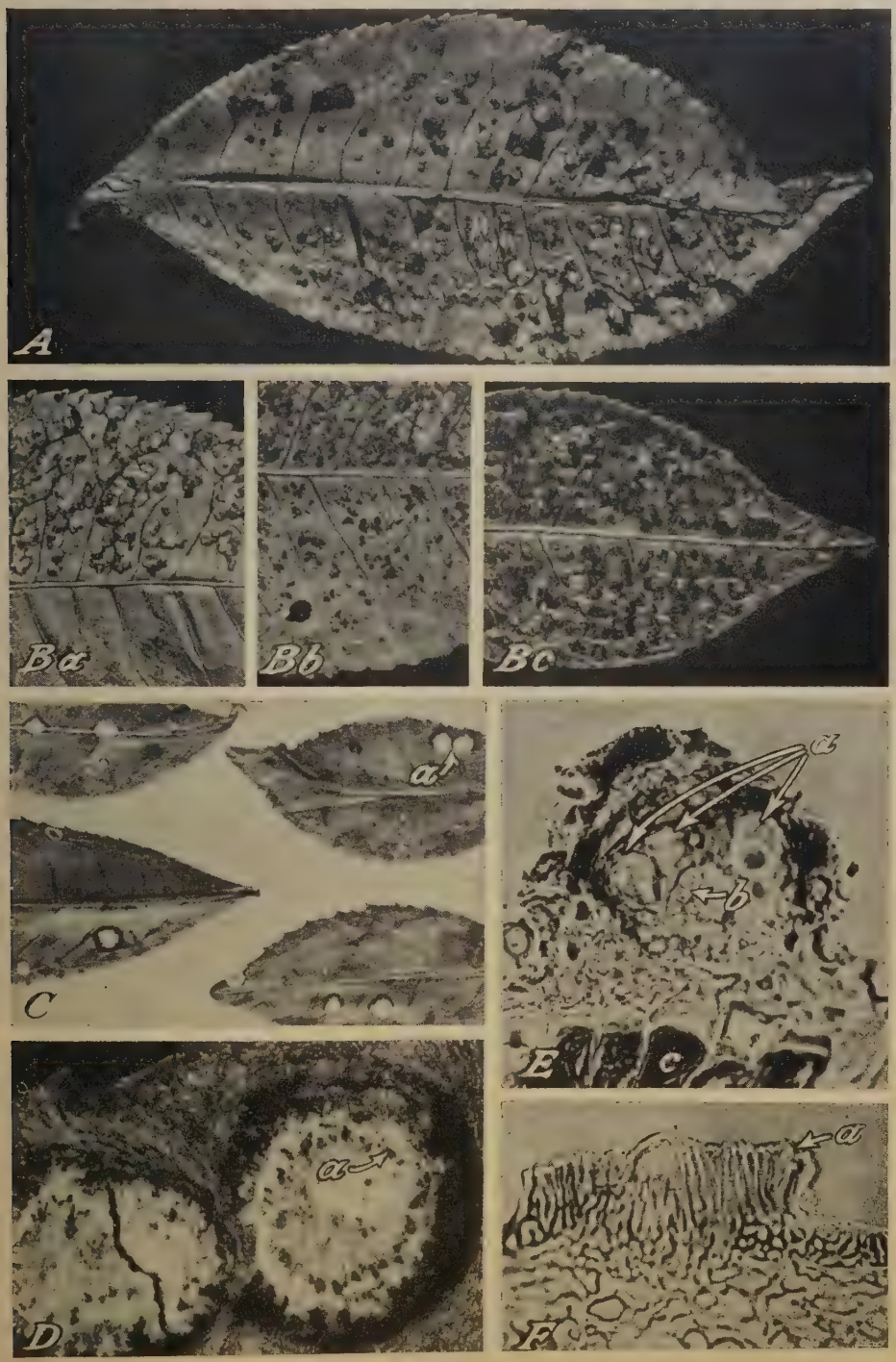
RIDGWAY, R. — 1912 — Color standards and color nomenclature. 43 p. Washington, D. C.

SMEE, C. — 1927 — First report on diseases of tea in Nyasaland. *Nyasaland Dept. Agr. Entom. Ser. Bull.*, No. 1 (6).

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 3

A e *B*. Verrugose mosqueada do chá causada por *Elsinoë theae*, parte do especimen de East Usambara Mountains, Setembro de 1940, H. H. STOREY. × 1. *C-F*. Verrugose branca do chá causada por *Elsinoë leucospila*. *C*, parte do especimen de Antigua, Guatemala, 1 de Janeiro de 1940, A. S. MÜLLER. × 1. *D*, Ampliação das duas manchas de *C*, *a*; as pintas pretas (*a*) são as frutificações de *Elsinoë*. × 12. *E*, Ascoma de uma das manchas em *C*, *a*; *a*, ascos; *b*, ascosporo que saiu de um asco; *c*, tecido em paliçada da fôlha. × 500. *F*. *Acérvulo*. × 500.

Fotos M. L. F. FOUBERT (*A-D*) e A. A. BITANCOURT (*E* e *F*).


A
Ba
Bb
Bc
a'
C
a
b
E
a
D
a
F

Vol. 17 — Art. 6 Setembro de 1946

SÔBRE A INFLUENCIA DO "CLOSTRIDIUM SPOROGENES" NA TOXINOGENESE TETANICA

POR

V. O. Guida e C. Rodrigues

Do Instituto Biologico de S. Paulo

SUMÁRIO

Introdução
Material e metodos
Ação impediente do *Cl. sporogenes* sobre a toxinogenese
Curva de produção do fator impediente
Atividade do fator impediente
Resistencia do fator impediente:
ao aquecimento
á acidez e á alcalinidade
Tipo-inespecificidade da impediencia
Especificidade de produção do fator impediente
Ausencia de permanencia do efeito inibidor
A toxina não é transformada em toxoide
Discussão e Resumo
Conclusões
Bibliografia

INTRODUÇÃO

O *Clostridium sporogenes* produz uma substancia em cuja presença o *Clostridium tetani* é muito fortemente tolhido na sua capacidade de formar toxina. Essa substancia, soluvel e filtravel, encontra-se abundantemente nos filtrados de culturas do *Cl. sporogenes*, já após a vegetação por 24 horas a 37° C, de tal forma que si semearmos neste filtrado esteril uma amostra fortemente toxigena de *Cl. tetani*, embora obtenhamos deste uma cultura abundante e normal, de todos os outros pontos de vista, sua toxinogenese efetuar-se-á de maneira extremamente reduzida.

A verificação precisa desse fato, entrevisto desde 1918 por CAILEY e outros, foi objéto de recente publicação de RODRIGUES & GUIDA, 1945.

Pôde então ficar evidenciado que essa inibição da toxinogenese tetanica não é indireta, isto é, não é ocasionada pela interferencia das condições tidas como desfavoraveis propriamente á formação da toxina. Foram excluidos, com efeito, de qualquer influencia no mecanismo de inibição, os seguintes fatores: modificações da composição do substrato das culturas, alterações do estado de anaerobiose e ocilações nocivas do pH do meio.

As observações aqui descritas, feitas em continuação das já publicadas, tiveram por objetivo maior delimitação do problema

suscitado pelo fenomeno, cuja análise tem a importancia de uma nova via para melhor conhecimento da toxinogenese tetanica.

Considerações de natureza pratica tornaram dignos de interesse especial os estudos complementares aqui relatados: contendo eles verificações adicionais quanto ao fenomeno, haveria, de um lado, possibilidade de reverter em beneficio terapeutico os conhecimentos obtidos desses ensaios e, de outro, não menos interessante possibilidade de explicar, não só a frequência de amostras atoxigenas do tetano, como a ausencia de intoxicações tetanicas de origem intestinal, apesar da presença frequênte do germen no intestino.

Por isso as experiencias que dão corpo a este trabalho são menos um conjunto homogeneo e equilibrado, do que uma serie de observações independentes, reunidas apenas pela razão de se referirem á análise experimental do mecanismo do mesmo fenomeno.

Estas observações dizem respeito, inicialmente, á curva de produção do fator inibidor produzido pelo *Cl. sporogenes*. Com isso se procurou saber qual o momento de maior concentração do impediente e a relação, porventura existente, entre seu teor e o estado de desenvolvimento da população bacteriana. Em seguida procurou-se medir grosseiramente a atividade desse agente, expressa pela maior diluição que ainda fosse capaz de provocar completa inibição da toxinogenese tetanica.

Outra serie experimental orientou-se para o reconhecimento de diferenças de sucetibilidade entre os principais tipos sorologicos do *Cl. tetani*.

Tentou-se então conhecer a resistencia do fator de inibição á influencia de alguns agentes fisicos e quimicos. Assim, determinou-se o efeito que sobre ele causam a temperatura e a concentração de ions de hidrogenio.

A questão da especificidade de produção foi analisada, sendo o fator procurado em diversas amostras da especie *sporogenes* e em amostras de outros anaerobios do genero *Clostridium*, afins do primeiro.

A permanencia do efeito inibidor, isto é, sua possivel influencia no estabelecimento de amostras de *Clostridium tetani* permanentemente atoxinogenicas, foi tambem objeto de análise.

Finalmente, em vista do resultado negativo da verificação anterior, procurou-se saber si a aparente atoxidez das culturas derivaria, não de perturbação da função toxinogenica do *Cl. tetani*, mas de transformação imediata da toxina formada, em toxoide, ou, quiçá, da formação direta de toxoide.

Cada uma dessas questões foi motivo de pesquisas experimentais que serão sucessivamente descritas.

MATERIAL E METODOS

De modo geral, a orientação seguida nas provas experimentais aqui relatadas não diferiu da que norteara os trabalhos preliminares (RODRIGUES & GUIDA, 1945). O substrato de cultura adotado, sempre o mesmo, é identico ao anteriormente descrito. Sempre que possivel, o substrato utilizado em uma serie comparativa provinha de uma mesma partida e era preparado recentemente ou, si não contraindicado, aquecido previamente á semeadura.

Para as semeaduras de *Cl. sporogenes*, ou de outros anaerobios nos quais se procurou evidenciar a produção de substancia inibidora, partiu-se sempre de cultura em caldo conforme TAROZZI.

As semeaduras da amostra TS de *Cl. tetani* foram agora feitas a partir de emulsão de esporos libertada da toxina por lavagens. As outras amostras de *Cl. tetani* eventualmente utilizadas tiveram seu inoculo constituido de cultura recente na massa de agar semi-solido. Nem sempre estes inoculos mostraram-se efetivos no estabelecimento da cultura; nesses casos, recorriamos a uma passagem em meio conforme TAROZZI.

As provas de toxidez, como de presença de toxoide, foram sempre efetuadas em camondongos de 18-22 gramas, tomando-se grupos de 2 animais para cada prova. As inoculações foram sempre efetuadas sob a pele, na raiz da cauda, sendo padronizado em 0,25 cc o volume inoculado. Os animais inoculados ficavam em observação durante seis dias.

CURVA DE PRODUÇÃO DO FATOR IMPEDIENTE

No interesse de determinar a sequencia de produção do fator inibidor do *Clostridium sporogenes*, sua relação com o desenvolvimento da cultura bacteriana e seu ulterior destino, foi organizada uma serie experimental que, em essencia, consistiu em obter filtrados de uma mesma cultura de *Clostridium sporogenes*, em diversas fases de evolução, analizando-se posteriormente o poder inibidor de cada um desses filtrados. Ao mesmo tempo observamos as variações sofridas pelo aspecto da cultura e pelo pH do meio.

Balões contendo 2.000 cc do substrato usual para a obtenção de toxina tetanica foram semeados com cultura recente, em TAROZZI, do *Cl. sporogenes* AN. Após os intervalos de 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 120, 168 e 240 horas de permanencia a 37°C, eram retiradas de cada um desses balões amostras de 100 cc que, depois de submetidas á analise de pH, de turvação e de preparações córadas, eram filtradas em velas Chamberland F ou L3, reajustadas ao pH 6,6 e conservadas em frigorifico. Quando obtidas todas essas provas estereis, juntamente com uma porção de substrato não semeado mas tambem submetido por 10 dias á temperatura de 37°C e filtrado, foram as doze porções de substrato inoculadas com esporos lava-

dos do *Cl. tetani* TS. Estes apresentaram vegetação franca em todas as porções, exceto nas de 24, 36, e 48 horas, que para florecer exigiram semeadura mais abundante.

Após um periodo de 5 dias de vegetação a 37°C do *Cl. tetani*, estas culturas foram refiltradas em vela Berkefeld N e inoculadas em camondongos, não diluidas ou na diluição de 1/100, e na dose de 0,25 cc.

Os resultados das provas finais de toxidez desses filtrados estão expressos na tabela 1 e por eles se verifica que a substancia inibidora aparece um pouco abrutamente, entre a 12.ª e 18.ª horas de cultura do *Cl. sporogenes*, periodo que aliás corresponde á intensidade maxima de proliferação do germen inibidor. A partir da 18.ª hora e até o 5.º dia, nosso metodo de verificação não permitiu distinguir diferenças de atividade entre os filtrados, que na sua concentração natural foram capazes de inibir completamente a toxinogenese tetanica. Do 7.º dia em diante houve um aparente enfraquecimento da capacidade inibidora.

A unica discrepancia verificada, relacionada com o filtrado de cultura de 24 horas do *Cl. sporogenes*, que não demonstrou praticamente nenhum poder inibidor, está em desacordo com as numerosas verificações anteriormente efetuadas, descritas em recente publicação, nas quais ficou repetidamente demonstrada a sua atividade; o insucesso aqui ocorrido deve ser, provavelmente, atribuido á necessidade de se repetirem por duas vezes as semeaduras do inoculo tetanico, sendo mesmo necessário utilizar, na ultima semeadura, cultura recente em TAROZZI.

Duas questões chamam a atenção nesta serie experimental: em primeiro lugar o fáto de filtrados de cultura de *Cl. sporogenes* de 24, 36, e 48 horas não permitirem tão facilmente como os demais o crescimento do *Cl. tetani*. Aparentemente existe, nesta fase, certa impediencia á proliferação do bacilo tetanico, embora restrita e facilmente dominada. Outra questão de certo interesse é a diminuição da atividade inibitória das culturas de *Cl. sporogenes* de mais de 5 dias, fato inesperado, porquanto em experiencias ulteriores ficou demonstrada uma grande resistencia deste agente inibidor a diversos agentes fisicos e quimicos; o que nos obriga a presupor uma ação destrutiva diréta do *Cl. sporogenes* sôbre a sua propria substancia inibidora.

A evolução da cultura do *Cl. sporogenes* pode ser rapidamente descrita da seguinte maneira: até 9 horas de incubação não se observam sinais macroscopicos de vegetação; esta começa a manifestar-se na 12.ª hora, denunciada por leve turvação. Ás 18 horas a turvação é abundante, com formação de gaz, sendo atingidas a turvação e gazogenese maximas em 24 horas. Daí por diante não se tornam perceptiveis alterações no aspecto da cultura. O pH original, 6,3, assim se mantem até 36 horas, quando se torna evidente uma leve acidificação, com queda até 6,0, para subir novamente a 6,6 na 48.ª hora, mantendo-se em torno desse valor até o

TABELA 1

Evolução da formação da substancia inibidora em cultura de *Cl. sporogenes*
Dosagem da toxina produzida pelo *Cl. tetani* cultivado nos filtrados de cultura de varias idades de *Cl. sporogenes*

Cultura de *Cl. sporogenes* filtrada após vegetar:	Sintomas em camondongos inoculados com culturas de 5 dias de *Cl. tetani*, filtradas, nas doses de:											
	0,0025 cc						0,25 cc					
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
3 horas	lc-lc	lc-c	c-c	ccc +	+		qm-ccc	+ +				
6 horas	lc-lc	lc-lc	c-c	cc-c	cc-c	cc-c	ccc-ccc	+ +				
9 horas	lc-lc	c-c	c +	cc	cc	+	ccc-cc	qm-qm	+ +			
12 horas	lc-lc	lc-lc	lc-c	lc-c	lc-c	lc-c	ccc-ccc	+ +				
18 horas	0-0	0-0	0 0	0-0	0-0	0-0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
24 horas	lc-lc	c-c	cc-c	ccc-ccc	+ +		ccc-ccc	qm +	+			
36 horas	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
48 horas	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
120 horas	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	lc-lc	qm-qm	+ +			
168 horas	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 lc	c-lc	c-lc	c-lc
240 horas	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	c-lc
Substrato virgem	lc-c	qm-qm	qm +	+			ccc +	+				

NOTA: — Foram inoculados 2 camondongos para cada dose

Legenda:

0 = ausencia de sintomas c = contrações ccc = contrações fortes + = morto
lc = leves contrações cc = contrações medias qm = quase morto

10.º dia. O aspecto morfologico da cultura denuncia-se a partir da 9.ª hora, com raros bastonetes de aspecto tipico; já na 12.ª hora as laminas são ricas. Esporos aparecem na 36.ª hora, e daí por diante dominam o quadro microscopico.

Resumindo os dados fornecidos por esta serie experimental, pudémos determinar que a atividade inibidora maxima de filtrados de cultura do *Cl. sporogenes* sobre a toxinogenese do *Cl. tetani* está compreendida entre os filtrados das culturas de 18 horas e 5 dias. Culturas anteriormente muito ativas teem sua atividade diminuida pela permanencia a 37°C além de 5 dias. Quando a atividade inibitória é maxima, observa-se tambem, embora pouco pronunciada, certa impediencia á proliferação do *Cl. tetani.*

ATIVIDADE DO FATOR IMPEDIENTE

A serie experimental que passamos a descrever foi delineada no intuito de medir a atividade inibitória dos filtrados de cultura de *Cl. sporogenes,* quando tomado na sua concentração natural maxima na cultura e diluido em proporções variaveis. Pretendeu-se tambem determinar si a inibição se instalava abruptamente, quando atingida certa concentração limite, ou si era possivel obter inibições parciais, relacionadas com o teor de substancia impediente, quando abaixo da concentração que provocava a inibição total.

Para a execução desta serie, tomámos cultura de 72 horas do *Cl. sporogenes* no substrato usual para toxina tetanica, filtrada em vela Chamberland F. Este filtrado esteril foi utilizado puro e diluido a 1/10, 1/50, 1/250 e 1/1.250, utilizando-se para as diluições o mesmo substrato usual para toxina tetanica. Estas cinco amostras, com o pH do meio ajustado a 6,6 e recobertas por vaselina, foram em seguida semeadas com emulsão de esporos da amostra TS de *Cl. tetani;* resultou sempre cultura abundante e pura, cuja toxidez foi verificada após cinco e dez dias de vegetação.

Na tabela 2 estão expostos os resultados da verificação de toxidez das culturas de *Cl. tetani,* em meio de cultura normal, em filtrado esteril de cultura de 72 horas de *Cl. sporogenes* e em substratos constituidos de misturas de ambos, de forma a se obterem concentrações de filtrado *sporogenes* de 10%, 2%, 0,4% e 0,08%.

Verifica-se pelo exame desta tabela que o filtrado de cultura de *Cl. sporogenes,* puro ou na concentração de 10%, é capaz de impedir até o 5.º dia a produção de toxina pelo *Cl. tetani,* de tal forma que 0,25 cc de filtrado de cultura deste germen, obtida nestas condições e após o lapso de 5 dias, ainda não é dotado de nenhum poder toxico evidenciavel. Já na proporção de 2%, ou menos, o filtrado de cultura do *Cl. sporogenes* apenas é capaz de influir na toxinogenese tetanica,

TABELA 2

Verificação sumaria da concentração de substancia inhibidora da toxinogenese tetanica em uma cultura de 72 horas de *Clostridium sporogenes* Pela vegetação do *Cl. tetani* em filtrado desta cultura, puro ou diluido em varias proporções

Substratos usados para vegetação do *Cl. tetani*	Sintomas em camondongos inoculados com:			
	Filtrado de cultura de 5 dias de *Cl. tetani* na dose de		Filtrado de cultura de 10 dias de *Cl. tetani* na dose de	
	0,0025 cc	0,25 cc	0,0025 cc	0,25 cc
Filtrado da cultura de *Cl. sporogenes* não diluido	0 0	0 0	0 0	$+^4$ $+^5$
Filtrado da cultura de *Cl. sporogenes* a 1/10	0 0	0 0	0 0	ccc ccc
Filtrado da cultura de *Cl. sporogenes* a 1/50	0 0	$+^2$ $+^3$	lc lc	$+^2$ $+^3$
Filtrado da cultura de *Cl. sporogenes* a 1/250	0 0	qm $+^5$	0 0	$+^2$ $+^3$
Filtrado da cultura de *Cl. sporogenes* a 1/1250	$+^3$ $+^4$	$+^2$ $+^2$	$+^2$ $+^2$	$+^1$ $+^1$
Substrato virgem	$+^2$ $+^2$	$+^1$ $+^1$	$+^2$ $+^2$	$+^2$ $+^2$

NOTA: — Foram usados 2 camondongos para cada inoculação. Leitura final, após 6 dias de observação.

0 = ausencia de sintomas
lc = leve contração
c = contração
cc = contração media

Legenda:
ccc = contração forte
qm = quase morto
$+^1$, $+^2$, $+^3$, etc. = morte em 1, 2, 3 dias, etc.

diminuindo-a. Quando a proporção desce a 0,08%, a mais baixa experimentada, ainda se pode verificar uma influencia depressora na toxinogenese, embora muito fraca.

Deixando-se que a cultura de *Cl. tetani* evolua durante 10 dias, verifica-se um aumento geral da toxidez, de tal forma que mesmo o filtrado natural da cultura *sporogenes*, não diluido, ainda permite a formação de um minimo de 4 doses letais minimas por centimetro cubico. Não obstante, mesmo depois de decorrido esse prazo de dez dias, a cultura mostra-se claramente influenciada pelo agente inibidor presente, pelo menos até a concentração minima de 0,4%.

Esse aumento de toxidez da cultura de *Cl. tetani* vegetada durante 10 dias, quando comparada com a da cultura de 5 dias, já havia sido observado nas experiencias iniciais, recentemente publicadas. Não decorre ele de um enfraquecimento do agente inibidor em

consequencia da conservação a 37°C durante tanto tempo. Experimentalmente foi verificado que filtrados de cultura de *Cl. sporogenes*, mantidos préviamente em estufa durante 10 dias, tinham a mesma ação que os conservados em geladeira. Demais, experiencias ulteriores demonstraram grande resistencia desse agente ao calor. Deve ser tambem aqui notado que o periodo de cultura necessário para que a amostra TS atinja sua toxidez maxima, quando vegetada no substrato aqui usado, experimentalmente se verificou ser de 5 dias.

Por si, o filtrado de cultura de *Cl. sporogenes* nenhuma ação toxica ou nociva tem sobre o camondongo.

Podemos inferir dos resultados experimentais obtidos, que ainda quando diluido 250 vezes o filtrado de cultura de *Cl. sporogenes* é capaz de evidenciar uma ação inibidora nitida, embora incompleta, sobre a toxinogenese tetanica.

A ação desta substancia depende pois de sua concentração no meio. Quando a concentração baixa aquem do limite de inibição total, pode-se notar que sua influencia se faz sentir pelo retardamento da toxinogenese e por menor intensidade desta. Embora não tenha ficado evidente que o retardamento seja proporcional á concentração da substancia inibidora no substrato, tornou-se claro que o volume de toxina formada é relacionado com essa concentração.

RESISTENCIA DO FATOR IMPEDIENTE

Como um passo inicial para determinação da natureza do fator de inibição da toxinogenese tetanica elaborado pelo *Cl. sporogenes*, resolvemos verificar a ação que sobre ele exercem as temperaturas entre 30° e 100° C, bem como concentração de ions de hidrogenio variando entre pH 4.5 e pH 9.0.

Resistencia ao aquecimento. Para a verificação da resistencia ao aquecimento tomamos 6 porções de 100 cc de filtrado de cultura de 72 horas do *Cl. sporogenes*, no substrato usual para obtenção de toxina tetanica; destas 6 porções, 5 foram submetidas, pelo espaço de 30 minutos, ás seguintes temperaturas, em banho-maria: 45°C, 55°C, 65°C, 80°C e 95°C (ebulição). Depois de resfriadas a 37°C, essas 5 porções, acrescidas de uma constituida por filtrado de cultura de *Cl. sporogenes* não aquecido e outra constituida de substrato original, virgem, porem filtrado como os demais, foram semeadas com esporos lavados de *Cl. tetani* TS.

Comparámos assim a toxinogenese da amostra de *Cl. tetani* TS, em meio original filtrado em vela, com a que se levou a efeito pela vegetação em filtrado de cultura de 72 horas do *Cl. sporogenes*, não

aquecido ou aquecido por 30 minutos ás temperaturas de 45°C, 55°C, 65°C, 80°C e 95°C. Os resultados dessa comparação constam da tabela 3. Por eles se depreende que mesmo o aquecimento a 95°C é incapaz de prejudicar sensivelmente a atividade do agente inibidor.

Mesmo o prolongamento da cultura de *Cl. tetani* por 10 dias não modificou o quadro final da experiencia, embora aqui, como em todas as demais provas efetuadas, tivessemos obtido vegetação e esporulação normais deste germen.

Dos resultados obtidos podemos portanto concluir que o agente inibidor da toxinogenese tetanica produzido pelo *Cl. sporogenes* não é aparentemente afetado pela exposição á temperatura de 95°C durante 30 minutos.

TABELA 3

Ação do calor sobre a substancia inhibidora da toxinogenese tetanica presente nos filtrados de cultura de *Cl. sporogenes*

Filtrado de cultura de *Cl. sporogenes* de 72 horas, submetido a diversas temperaturas
Verificação da presença de toxina após cultura de *Cl. tetani*, em amostras aquecidas ou não deste filtrado

Substratos usados para vegetação do *Cl. tetani*:	Sintomas em camondongos inoculados com:			
	Filtrado de cultura de 5 dias de *Cl. tetani* na dose de		Filtrado de cultura de 10 dias de *Cl. tetani* na dose de	
Filtrados de cultura de *Cl. sporogenes* aquecidos a:	0,0025 cc	0,25 cc	0,0025 cc	0,25 cc
45°C 30'	0 0	0 0	0 0	0 0
55°C 30'	0 0	0 0	0 0	0 0
65°C 30'	0 0	0 0	0 0	0 0
80°C 30'	0 0	0 0	0 0	0 0
95°C 30'	0 0	0 0	0 0	0 0
Testemunhas				
Filtrado de cultura de *Cl. sporogenes* não aquecido	0 0	0 0	0 0	0 0
Substrato virgem não aquecido	cc cc	$+^2$ $+^2$	$+^3$ $+^3$	$+^1$ $+^1$

NOTA: — Usados 2 camondongos para cada inoculação. Leitura final, após 6 dias de observação.

Legenda:

0 = ausencia de sintomas
lc = leve contração
c = contração
cc = contração média
ccc = contração forte
qm = quase morto
$+^1$, $+^2$, $+^3$, etc. = morte em 1, 2, 3 dias, etc.

Resistencia á acidez e á alcalinidade moderadas. Esta serie experimental foi disposta de tal forma que diferentes porções de filtrado de cultura de *sporogenes* ficassem submetidas durante 24 horas á ação da temperatura de 37°C e de concentrações de ions de hidrogenio variando entre pH 4,5 e pH 9,3. Em seguida o pH de cada uma destas porções era reajustado a 6,6 após o que eram elas semeadas com emulsão de esporos lavados da amostra de *Cl. tetani* TS. As verificações de toxidez foram ainda aqui feitas após o 5.° e o 10.° dias da vegetação, que ocorreu franca e uniformemente.

Uma cultura de 72 horas do *Cl. sporogenes*, em substrato usual para a obtenção de toxina tetanica, foi filtrada em vela Chamberland F e o filtrado esteril distribuido em tubos, em porções de 100 cc, recobrindo-se cada porção com uma camada de vaselina esteril; em seguida o pH dessas diferentes porções foi ajustado, por meio de quantidades convenientes de HCl ou de NaOH, de modo a obter as seguintes concentrações: pH 4,5, pH 5,4, pH 6,6, pH 7,3, pH 8,3 e pH 9,3. Os tubos assim tratados foram colocados na estufa a 37°C, onde permaneceram durante 24 horas, após o que se ajustou novamente o pH de todas as porções a 6,6, sendo então nelas semeada a emulsão de esporos da amostra TS do *Cl. tetani*. Após vegetação de 5 e 10 dias estas culturas, que se desenvolveram normalmente, foram refiltradas e injetadas em camondongos, para prova de toxidez.

Os resultados das provas de toxidez das culturas de *Cl. tetani*, obtidas nas condições acima referidas, estão representados na tabela 4. Vê-se claramente, através estes resultados, que a ação de acidez ou alcalinidade moderadas não é suficiente para destruir ou sequer perturbar a eficiencia do agente inibidor, que se apresentou nos tubos mantidos sempre a pH 6,6 com a mesma atividade que nos submetidos temporariamente a pH baixo ou alto. Da comparação dos resultados obtidos com filtrados de 5 e 10 dias, tambem mais uma vez se infere que o *Cl. tetani* pode, com o tempo, vencer até certo ponto a influencia inibidora do fator produzido pelo *sporogenes*.

Em resumo, as provas efetuadas testemunham que acidez tão alta como a que redunda no pH 4,5, ou alcalinidade tão elevada como a que se reflete no pH 9,3, são insuficientes para destruir a substancia inibidora da toxinogenese tetanica, produzida pelo *Cl. sporogenes*, mesmo quando atuam a 37°C e durante 24 horas.

TIPO-INESPECIFICIDADE DA IMPEDIENCIA

De acordo com trabalhos efetuados por CAILEY, podia-se supor a existencia de diferenças de sucetibilidade dos diversos tipos de *Cl. tetani*, quanto á sua toxinogenese, quando submetidos á ação da

TABELA 4

Influencia do pH sobre a substancia inhibidora da toxinogenese tetanica, presente nos filtrados de cultura de *Cl. sporogenes*
Filtrado de cultura do *Cl. sporogenes* de 72 horas, submetido durante 24 horas a influencia de pH variando entre 4,5 e 9,3, reajustado a 6,6
Verificação da presença de toxina após cultura do *Cl. tetani* nestas diversas amostras de filtrado

Substrato usado para vegetação de *Cl. tetani:* / Filtrado de *Cl. sporogenes* submetido 24 horas a	Sintomas em camondongos inoculados com:								
	Filtrado de cultura de 5 dias em *Cl. tetani*, na dose de		Filtrado de cultura de 5 dias de *Cl. tetani* na dose de:						
	0,0025 cc	0,25 cc	0,0025 cc	0,25 cc					
	6 ds	6 ds	6 ds	1 d	2 ds	3 ds	4 ds	5 ds	6 ds
ph 4.5	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
ph 5.4	0 0	0 0	0 0	lc 0	lc lc	lc c	lc c	c c	c c
ph 6.6	0 0	0 0	0 0	0 0	lc lc	lc lc	lc lc	lc lc	lc lc
ph 7.3	0 0	0 0	0 0	lc lc	c c	cc ccc	qm +	+	
ph 8.3	0 0	0 0	0 0	lc lc	lc lc	c c	cc +	ccc	+
ph 9.3	0 0	0 0	0 0	lc 0	lc lc	lc c	c +	+	

NOTA: — Usados 2 camondongos para cada inoculação.

Legenda:

0 = ausencia de sintomas
lc = leve contração
c = contração
cc = contração média
ccc = contração forte
qm = quase morto
\+ = morto

substancia inibidora do *Cl. sporogenes*. Segundo aquela autora, os tipos sorologicos II e III de *Cl. tetani* mostraram-se mais resistentes que o tipo I á ação da presença dos contaminantes com que lidou.

Para reestudar essa questão utilisamos varias amostras de *Cl. tetani* de que dispomos na Coleção de Anaerobios do Instituto Biologico, as quais submetemos, em identicas condições, á ação do agente inibidor da toxinogenese tetanica produzido pelo *Cl. sporogenes*.

As amostras de *Cl. tetani* utilizadas para as experiencias foram as seguintes:

1) Anaerobio 305 = NCTC n.º 540. Type II. Miss M. ROBERTSON T 67 (Tetanus patient, 1917).

2) *Clostridium tetani*, amostra BERTARELLI; oferecido ao Serviço por Dr. O. BIER; sem historia.

3) Anaerobio 287 = NCTC n.º 279. Type I. Stock Culture of unknown origin, purified by Miss M. ROBERTSON. USA. II.

4) Anaerobio 61 = *Clostridium tetani*, amostra MULFORD, n.º 232 do Instituto Butantan, São Paulo.

5) Anaerobio 284 = NCTC n.º 539. Type III. Miss M. ROBERTSON R 220. E (Tetanus patient, 1917).

6) Anaerobio 40 = *Clostridium tetani*, amostra Manguinhos, recebida de Dr. FLAVIO FONSECA; sem historico. Era na ocasião a amostra utilizada no Instituto Oswaldo Cruz, para o preparo da toxina.

7) Anaerobio 66 = *Clostridium tetani*, amostra FLEXNER; n.º 233 do Instituto Butantan.

8) Anaerobio 281 = *Clostridium tetani*, amostra PEASE, recebido do Instituto Butantan; provem de Dr. NORTON KAHN, Bureau of Laboratories, Michigan Department of Health.

9) Anaerobio 341 = *Clostridium tetani* recebido do Instituto Pinheiros; sem historia; é a amostra lá usada para obtenção de toxina.

10) Anaerobio 267 = Proveniente do Instituto Butantan, com as seguintes indicações; Dr. J. W. MCLEOD, University of Leeds; *Clostridium tetani*, strain "Gough"; infective wound.

11) Anaerobio AE = *Clostridium tetani*, amostra 60 de ZEISSLER, C. f. B. 1929, 110, 24-44.

12) Anaerobio 166 = Recebido do Instituto Butantan, com as seguintes indicações: Dr. R. S. SPRAY, West Virginia; *Clostridium tetani* n.º 14, from Hall n.º 10; no history.

13) Anaerobio 250 = Recebido do Instituto Butantan, com as seguintes indicações: Dr. J. B. GUNNISON; *from* K. F. Meyer's colletion, University of California, S. Francisco; *Clostridium tetani* type III.

Entre essas amostras figuram algumas reconhecidas como dos tipos sorologicos II e III. Por nos faltarem os soros especificos, não pudémos reverifica-las. Outras das amostras incluidas caracterizam-se por sua alta capacidade toxigena. Outras ainda são mundialmente conhecidas.

A tecnica empregada nesta verificação não foi diferente, em suas linhas gerais, das que serviram ás outras. Tomámos uma cultura de 72 horas do *Cl. sporogenes* AN, em substrato favoravel á toxinogenese tetanica; esta cultura foi filtrada em vela Chamberland F e o filtrado, depois de verificar se esteril e de ter seu pH acertado a 6,6, foi distribuido em tubos grossos, no volume de 100 cc para cada tubo. Ao mesmo tempo, outra parte do substrato original, não semeada nem filtrada, foi tambem distribuida em nova serie de tubos grossos, 100 cc cada.

As amostras de *Cl. tetani* foram previamente analizadas, tendo apresentado caracteres morfologicos e culturais normais. Imediatamente antes da semeadura no substrato acima descrito, foram reativadas por sucessivas passagens em agar mole.

As culturas das diversas amostras empregadas mostraram-se sempre tipicas e normais, quer no substrato constituido por filtrado de *sporogenes*, quer no testemunha. O aspecto geral macroscopico, o quadro microscopico, e a evolução do pH nada ofereceram digno de nota. A esporulação deu-se sempre regularmente.

Depois de 5 e 10 dias de evolução, cada uma das culturas foi filtrada em vela Berkfeld N e seu teor toxico determinado em camondongos. Na tabela 5 pode-se observar o resultado geral das experiencias.

A amostra 61, que é a conhecida amostra Mulford, mostrou-se inteiramente atoxigena, pelo que não é incluida. As demais experimentadas mostraram-se sensiveis ao fator de inibição do *sporogenes*. Os tipos I, II e III comportaram-se de identica maneira. O fato de possuirem as amostras experimentadas uma capacidade toxigena mais intensa ou menos intensa não pareceu influir na ação do inibidor, podendo-se até verificar que amostras fracas produtoras de toxina, como as de designação AE e 166, sofriam aparentemente menos influencia que outras fortemente toxigenas.

Resumindo: dos resultados observados pode-se concluir que o efeito da substancia inibidora produzida pelo *Cl. sporogenes* se faz sentir na toxinogenese de uma grande variedade de amostras de *Cl. tetani*, incluindo-se os tipos sorologicos I, II e III. Ha pois forte probabilidade de ser esse efeito de carater geral, abrangendo todas as variedades da especie. E isso não deve de nenhuma forma causar surpreza, pois, embora se tenham podido reconhecer no *Cl. tetani* numerosas variedades sorologicas, a toxina por elas produzida tem sempre exatamente a mesma constituição, o que leva a crer que seu mecanismo de formação seja sempre o mesmo.

TABELA 5

Atividade da substancia inhibidora produzida pelo *Clostridium sporogenes* sobre diferentes amostras de *Clostridium tetani*

Amostra de *Cl. tetani* estudada	Verificação da presença de toxina tetanica pela inoculação em camondongos							
	Filtrado de cultura do *Cl. tetani* de 5 dias em				Filtrado de cultura do *Cl. tetani* de 10 dias em			
	Filtrado de cultura de 72 horas do *Clostridium sporogens* sob vaselina		Meio standard para produção de toxina tetanica		Filtrado de cultura de 72 horas do *Clostridium sporogens* sob vaselina		Meio standard para produção de toxina tetanica	
	Dose inoculada em camondongos							
	0,0025 cc	0,25 cc	0,0025 cc	0,25 cc	0,0025 cc	0,25 cc	0,0025 cc	0,25 cc
	Dois camondongos	Dois camondongos	Dois camondongos	Dois camondongos	Dois camondongos	Dois camondongos	Dois camondongos	Dois camondongos
Anaerobio 305 . . .	0 0	0 0	cc lc	+ +	0 0	0 0	+ +	+ +
Tetano Bertarelli . .	0 0	+ +	0 0	ccc c	0 0	0 0	+ +	+ +
Anaerobio 287 . . .	0 0	0 0	+ +	+ +	0 0	0 0	+ +	+ +
Anaerobio 40 . . .	0 0	0 0	+ +	+ +	0 0	0 0	+ +	+ +
Anaerobio 66 . . .	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	+ +	+ +
Anaerobio 281 . . .	0 0	0 0	+ +	+ +	0 0	0 0	+ +	+ +
Anaerobio 89 . . .	0 0	0 0	+ +	+ +	0 0	lc lc	+ +	+ +
Anaerobio 267 . . .	0 0	0 0	lc lc	+ +	0 0	0 0	+ +	+ +
Anaerobio 284 . . .	0 0	0 0	+ +	+ +	0 0	0 0	+ +	+ +
Tetano AE	0 0	0 0	+ +	+ +	0 0	lc lc	0 0	lc lc
Anaerobio 166 . . .	0 0	0 0	0 0	+ +	0 0	lc lc	0 0	+ +
Anaerobio 250 . . .	0 0	0 0	+ +	+ +	0 0	0 0	+ +	+ +

NOTA: — Resultado final, após 6 dias de observações.

Legenda: 0 = ausencia de sintomas; lc = leve contração; c = contração; cc = contração média; ccc = contração forte; qm = quase morto; + = morte.

ESPECIFICIDADE DE PRODUÇÃO DO FATOR INIBIDOR

Pertencendo o *Cl. sporogenes* a um grande grupo de anaerobios esporulados cujos caracteres morfologicos e culturais pouca distinção revelam entre uns e outros, pareceu-nos interessante verificar tambem si, em primeiro lugar, a produção do agente inibidor da toxinogenese tetanica seria atributo geral da especie *sporogenes*, e em segundo, si as bactérias afins desta especie participavam tambem de sua produção.

Dado que, apesar do muito que tem sido pesquizado a respeito, persiste ainda certa desorientação nos reconhecimento e determinação destas especies do "grupo sporogenes", seguimos um criterio proprio na escolha das amostras verificadas. Esse criterio baseou-se em resultados parciais de um estudo de numerosas amostras do grupo, o qual vem sendo levado a efeito por um de nós e cujos resultados já permitem certa segurança no desdobramento do grupo em especies.

As amostras verificadas podem ser agrupadas da seguinte forma:

A) Germens com caracteres morfologicos, culturais e de colonias homogenios, indiferençaveis uns dos outros por esses criterios. Caracteres gerais indiferençaveis do que se atribuem geralmente ao *Clostridium sporogenes*.

I) Toxicos

Anaerobio 14 = *Clostridium botulinum* tipo A, n.º 456 da coleção americana.

Anaerobio 179 = *Clostridium botulinum*, amostra 6 de Zeissler, Altona,

II) Atoxicos

Anaerobio 117 = Recebido do Instituto Butantan, sob n.º 1.180-128; dado como *Clostridium fallax*, proveniente do Instituto Pasteur, Paris.

Anaerobio 1601 = Recebido do D. N. S. P., Rio de Janeiro; dado como *Clostridium botulinum*, sem outra indicação.

Anaerobio 190 = Recebido do Instituto Butantan, com as seguintes indicações: *Clostridium parabotulinum* tipo B, remetido por Ida Bengston. Desta cultura puderam ser isoladas varias amostras, das quais a aqui utilizada tem a designação "190 chata".

Anaerobio 278 = Recebido do Instituto Butantan, com as seguintes indicações: *Clostridium parabotulinum* B, da Coleção de Dr. K. F. Mayer, remetido por Dr. J. B. Gunnison.

Anaerobio 74 = Recebido do Instituto Butantan sob a designação de *Clostridium sporogenes* e o n.º 1331; proveniente do Instituto Pasteur, Paris.

Anaerobio 97 = Recebido do Instituto Butantan sob a designação *Clostridium sporogenes* e o n.º 1333-3; proveniente do Instituto Pasteur, Paris.

Anaerobio 11 = Recebido do Prof. Carini, S. Paulo, sob a designação: *Clostridium chauvoei*, amostra Viena. Desta cultura foram isoladas varias amostras, das quais a aqui utilizada tem a designação "11 verrucosa".

Anaerobio 223 = Recebido do Instituto Butantan com as seguintes indicações: *Clostridium botulinum* da Coleção de Dr. Frappier; remetido por Dr. Fredette, Montreal, Canadá.

B) Germens com caracteres de colonia, morfologicos e culturais homogeneos, identicos aos que normalmente se atribuem ao *Clostridium bifermentans.*

Anaerobio 196 = Recebido do Instituto Butantan sob a designação de *Clostridium bifermentans* e com as seguintes indicações: *Bacillus putrificus tenuis* n.º 50 de Zeissler, Altona.

Anaerobio 125 = Recebido do Instituto Butantan sob a designação de *Clostridium bifermentans* e o n.º 1324; proveniente do Instituto Pasteur, Paris.

Anaerobio AA = Recebido de Zeissler, Altona, com as seguintes indicações: *Bacillus putrificus tenuis* n.º 24.

Anaerobio BW = Recebido de Weinberg, Paris, sob designação: *Bacillus bifermentans.*

C) Representante de um grupo, de caracteres morfologicos, culturais e de colonia homogenios, abrangendo a grande maioria das amostras por nós recebidas, rotuladas como *Clostridium parabotulinum.*

Anaerobio 182 = Recebido do Instituto Butantan, com a seguinte designação: *Clostridium Botulinum* tipo A, n.º 7 de Hall.

D) Representante de um grupo, de caracteres morfologicos, culturais e de colonia homogenios, abrangendo a grande maioria das amostras por nós recebidas, rotuladas como *Clostridium putrificum.*

Anaerobio 122 = Recebido do Instituto Butantan sob a designação de *Clostridium putrificum* e o n.º 1298.

Alem destes germens, acrescentámos á nossa serie representantes de outros grupos de anaerobios esporulados, tomados entre especies sacaroliticas. Necessariamente só pudemos dispor aqui de germens apatogenicos, pelo que os anaerobios da gangrena deixaram de ser incluidos. Os grupos estudados foram os seguintes:

E) Representante do grupo formado principalmente por amostras recebidas como *Clostridium cochlearium*:

Anaerobio AB = Recebido de Zeissler, Altona, com a designação de *Bacillus cochlearius*, amostra n.º 2.

F) Representantes do grupo formado principalmente por amostras recebidas como *Clostridium tertium.*

Anaerobio 58 = Recebido de Zeissler, Altona, com a designação de *Bacillus sphenoides* e o n.º 2.

G) Representantes do grupo formado principalmente por amostras recebidas como *Clostridium multifermentans.*

Anaerobio 311 = Recebido do Instituto Butantan, com as seguintes indicações: *Clostridium multifermentans — Bacillus multifermentans tenalbus*, n.º 2032 da N. C. T. C., Londres.

Anaerobio AH2 = Recebido de Zeissler, Altona, sob a designação de *Bacillus multifermentans* e o n.º 2.

Alem destas diversas amostras de anaerobios e em consequencia de observações de GATÉ e colaboradores, acerca da influencia da *Klebsiella pneumoniae* (Bacilo de Friedländer) na toxinogenese difterica, pareceu-nos aconselhavel incluir tambem aqui uma amostra deste germen, para ver si tambem na toxinogenese tetanica ele era capaz de exercer qualquer influencia. Infelizmente a amostra desta especie que conseguimos obter não se apresentou rigorosamente tipica, quando analisado seu comportamento cultural. Talvez por esse motivo ela se mostrou inteiramente inerte em relação á toxinogenese tetanica.

Para a verificação da presença de substancia inibitoria nas culturas dos diferentes germens experimentados, obedecemos á seguinte tecnica: tubos contendo aproximadamente 100 cc de meio de cultura usual para a produção de toxina tetanica eram semeados com 1 cc de cultura de 24 horas, em Tarozzi, de cada um dos germens anaerobios a verificar e, simultaneamente, com uma emulsão de esporos lavados de amostra TS de *Cl. tetani*. A vegetação e as alterações de pH foram acompanhadas regularmente. No fim do 5.º e do 10.º dias de vegetação, uma parte de cada cultura foi retirada e filtrada em vela Berkefeld N, inoculando-se 2 camondongos com 0,25 cc deste filtrado puro e outros dois om 0,25 cc de sua diluição a 1%. Uma cultura de controle, contendo apenas o *Cl. tetani* TS, foi em seguida filtrada e inoculada da mesma maneira.

A maioria das amostras experimentadas, assim como o *Cl. tetani*, vegetaram bem e rapidamente no substrato de cultura empregado, de tal forma que já após 24 horas de incubação o crescimento era intenso. No caso particular do *Cl. putrificum* e do *Cl. cochlearium*, cuja vegetação é mais tardia e lenta, esperou-se primeiro que o crescimento desses germens atingisse uma fase mais adiantada, para só então acrescentar á cultura os esporos lavados da amostra TS.

Os resultados das provas experimentais efetuadas estão expressos e facilmente apreciaveis na tabela 6. Deles se depreende que diversas amostras de germens com os caracteres culturais do *Cl. sporogenes* se mostraram capazes de produzir a substancia inibidora da toxinogenese tetanica, tudo levando a crer que seja esta uma propriedade geral da especie *sporogenes*. Da mesma forma, a amostra analisada de *Cl. putrificum* mostrou-se capaz de provocar o fenomeno de inibição. Todos os demais germens utilizados se mostraram inteiramente destituidos de ação na toxinogenese tetanica. As proprias amostras proteoliticas de *Cl. botulinum*, apesar de se apresentarem indistinguiveis do *Cl. sporogenes*, quer por suas propriedades culturais, quer pelo aspecto morfologico de germens e de colonias, não puderam inibir a toxinogenese. É verdade que, possuindo estas amostras toxidez intrinseca, a ação desta poderia mascarar a possivel inativação da toxina tetanica; entretanto, dado que os sintomas de tetano não se podem confundir com os de botulismo, somos levados a crer que nos filtrados destas duas culturas estava presente, tambem, a toxina tetanica.

O *Cl. bifermentans*, parente proximo do *Cl. sporogenes*, retarda a toxinogenese tetanica. Isso resaltou do exame de tres amostras desta especie; mas no fim do 10.º dias de cultura a toxina formada na presença do *bifermentans* é tão ativa como a do tubo controle.

TABELA 6

Verificação da presença da substancia inibidora em filtrados de cultura de *Cl. sporogenes* e afins
Verificação de toxina formada pelo *Cl. tetani* quando vejetado em tais filtrados

Amostras de *Clostridium sporogenes* e afins usadas	Filtrado de cultura de 5 dias de *Cl. tetani*		Filtrado de cultura de 10 dias de *Cl. tetani*	
	Camondongos inoculados com		Camondongos inoculados com	
Filtrado de	0,0025 cc	0,25 cc	0,0025 cc	0,25 cc
Cl. botulinum - tipo A n.º 14	+ +	+ +	+ +	+ +
Cl. botulinum n.º 179 . . .	0 0	+ +	+ +	+ +
Cl. sporogenes n.º 117 . . .	0 0	0 0	0 0	cc cc
Cl. sporogenes n.º 1601 . .	0 0	0 +	0 0	lc lc
Cl. sporogenes n.º 190 . . .	0 0	0 0	+ +	+ +
Cl. sporogenes n.º 278 . . .	0 0	0 0	0 0	lc lc
Cl. sporogenes n.º 74 . . .	0 0	0 0	0 0	c cc
Cl. sporogenes n.º 97 . . .	0 0	ccc +	0 0	+ +
Cl. sporogenes n.º 11 . . .	0 0	0 0	0 0	0 0
Cl. sporogenes n.º 223 . . .	0 0	0 0	0 0	+ +
Cl. bifermentans n.º 196 . .	0 0	lc lc	+ +	+ +
Cl. bifermentans n.º 125 . .	0 qm	+ +	+ +	+ +
Cl. bifermentans AA . . .	qm +	+ +	+ +	+ +
Cl. bifermentans B. W. . .	0 0	0 0	lc lc	+ +
Cl. parabotulinum n.º 182 .	+ +	+ +	+ +	+ +
Cl. putrificum n.º 122 . . .	0 0	+ +	0 0	0 0
Cl. cochlearium AB	— —	— —	qm +	+ +
Cl. tertium n.º 58	0 0	0 0	qm +	+ +
Cl. tertium AC²	lc +	+ +	+ +	+ +
Cl. multifermentans n.º 311	qm +	+ +	+ +	+ +
Cl. multifermentans AH² .	+ +	+ +	+ +	+ +
Klebsiella pneumoniae ? . .	+ +	+ +	+ +	+ +
Substrato virgem	+ +	+ +	+ +	+ +

NOTA: — Inoculados 2 camondongos com cada dose.
Os sintomas foram observados até 6 dias.

Legenda:

0 = ausencia de sintomas
lc = leve contração
c = contração
cc = contração média
ccc = contração forte
qm = quase morto
\+ = morto

O *Clostridium parabotulinum*, que é toxigeno, o *Cl. cochlearium* e o *Cl. multifermentans*, ambos atoxicos, não se mostraram capazes de perturbar a toxinogenese tetanica de nenhuma maneira.

As duas amostras estudadas de *Cl. tertium* se comportaram de forma desigual: uma delas manifestou ação retardadora, outra mostrou-se inativa.

Finalmente, a amostra recebida como *Klebsiella pneumoniae* não demonstrou qualquer ação na toxinogenese tetanica, nas condições de nossas observações.

Das experiencias efetuadas pode-se concluir que apenas o *Cl. sporogenes* e o *Cl. putrificum* são dotados da capacidade de produzir uma substancia capaz de inibir a toxinogenese tetanica. Na especie *sporogenes*, essa propriedade é, aparentemente, geral. Mostraram-se destituidas de qualquer ação prejudicial á toxinogenese ou á toxina tetanica representantes das seguintes especies de anaerobios esporulados: *Cl. botulinum*, *Cl. parabotulinum*, *Cl. cochlearium*, *Cl. tertium*, *Cl. multifermentans*. Ação retardadora da toxinogenese demonstrou o *Cl. bifermentans*.

AUSENCIA DE PERMANENCIA DO EFEITO INIBIDOR

A frequencia da presença do *Clostridium sporogenes* no tubo intestinal humano e dos animais, aliada á inibição da toxinogenese tetanica que essa presença acarreta in-vitro, apresenta-se como razão possivel para explicar a inexistencia de casos suficientemente demonstrados de tetano, de origem intestinal, apesar de não ser um fato raro a presença tambem do *Cl. tetani* no intestino.

A ocurrencia de amostras atoxicas deste germen, encontradiças no solo e mesmo em fézes, fez-nos ainda supor que a coexistencia com o *sporogenes* durante um tempo prolongado poderia provocar, no Cl. *tetani*, uma perturbação de caracter permanente no mecanismo da toxinogenese, vindo talvez daí a formação de amostras atoxicas.

Submetendo a uma prova esta hipotese, semeámos *Cl. tetani* em filtrado de cultura de *Cl. sporogenes* e procurámos verificar, depois de periodos variados de permanencia a 37°C, não só a presença de toxina nesta propria cultura, como tambem em seus repiques para meio normal, após a influencia de contacto prolongado com o filtrado de *sporogenes*.

Como resultado da prova feita foi possivel deixar assentado que não se cria na amostra de *Cl. tetani* assim tratada nenhuma incapacidade permanente para formar toxina. Logo que a libertámos da

presença do filtrado de *sporogenes*, a amostra de *Cl. tetani* volta a produzir toxina com a mesma intensidade anterior. Mais ainda: si inocularmos em animal sensivel uma pequena quantidade da cultura atoxica, não filtrada, do *Cl. tetani* em filtrado de *sporogenes*, este animal apresentará tetano e morrerá, demonstrando assim que logo que a substancia inibidora tenha sido absorvida e eliminada, os bacilos tetanicos existentes no inoculo produzirão toxina.

Este fato não está em desacordo, senão aparentemente, com as observações originais de CAILEY e outros, quando estes verificaram que a concomitancia de *Cl. tetani* e *Cl. sporogenes* em feridas não levava á intoxicação tetanica. Nas inoculações por nós efetuadas, o *Cl. sporogenes* não estava presente, mas apenas o filtrado de sua cultura, que provavelmente era eliminado com grande rapidez e não tinha possibilidade de ser substituido.

Das series experimentais efetuadas, ficou pois evidente, que é necessaria a presença do *Cl. sporogenes* ou da substancia inibidora por ele produzida, para que se observe o fenomeno da supressão da toxinogenese tetanica. Este efeito deixa de aparecer logo que a amostra de *Cl. tetani* se liberte da presença imediata do inibidor. O mecanismo de formação de toxina não sofre pois nenhuma perturbação permanente, mesmo após um contato muito prolongado com o filtrado de *sporogenes*.

O maior periodo de contato verificado foi de 135 dias.

A TOXINA NÃO É TRANSFORMADA EM TOXOIDE

Dado que não se pôde verificar nenhuma perturbação direta no aparelho produtor de toxina e considerando-se que para a avaliação da presença desta, toda nossa experimentação se baseou na ação especifica sobre o animal sensivel, surgiu naturalmente a hipotese de não haver alteração direta de nenhuma natureza na toxinogenese propriamente dita, mas antes uma detoxicação da toxina á medida que fosse sendo formada, ou ainda méra modificação da toxinogenese, de tal forma que o produto primario desta atividade passasse a ser toxoide, substancia estavel para a qual, como é sabido, a instavel toxina tetanica tende naturalmente.

Algumas experiencias foram portanto encaminhadas no sentido de procurar, nas culturas atoxicas de *Cl. tetani* obtidas em filtrado de *sporogenes*, substancias capazes de neutralizar a antitoxina tetanica, abrangendo portanto tambem o toxoide.

Utilizámos para isso tecnica semelhante á já empregada por BÄCHER, KRAUS e LÖWENSTEIN, 1925, conforme citação de SORDELLI, 1936, para avaliar o conteudo antigenico de toxoides tetanicos, tais como são empregadas para a vacinação contra o tetano. Esta tecnica tem sido correntemente empregada por um de nós, como parte da rotina de preparo e de avaliação de antigenos vacinantes contra o tetano. Seus resultados, ainda ineditos, têm sido bastante favoraveis.

Em termos gerais, a tecnica adotada consistiu em colocar 0,5 cc de filtrado da cultura analisada em contato com 2 TD (0,2 UA) de soro antitoxico contra o tetano, dissolvidos em 0,5 cc de solução fisiologica, e depois de um periodo de contato de 30 minutos a 37°C, acrescentar 1 TD (L +) de toxina padrão, dissolvido tambem em 0,25 cc de solução fisiologica. Depois de um novo periodo de contato de 30 minutos a 37°C a quarta parte do volume total era inoculada, subcutaneamente, na raiz da cauda de cada um de dois camondongos.

Os resultados da analise de tres filtrados, obtidos a partir de tres amostras diferentes de *Cl. tetani*, demonstraram que esses filtrados não continham o minimo de 2 L + por cc, quando a taxa normalmente observada por um de nós, em toxinas habituais, nunca é menor que 5 L + por cc, atingindo frequentemente valores até 50 L + por cc.

Ha pois uma indicação ponderavel da não existencia, nas culturas de *Cl. tetani* obtidas em filtrado de cultura de *Cl. sporogenes*, de toxina tetanica modificada ou toxoide. Fica assim reforçada a suposição de ser a toxinogenese suprimida em sua raiz e não apenas alterada a toxina durante o processo de sua formação ou imediatamente em seguida a ele.

DISCUSSÃO E RESUMO

O fato de ser o *Clostridium sporogenes* capaz de influir no metabolismo normal do *Clostridium tetani*, impedindo que se manifeste uma de suas funções mais caracteristicas: a produção de toxina, ficou bem estabelecido em nossa publicação anterior. Este fato prendeu especialmente nossa atenção pela possibilidade que apresentava, de se tirar dele proveito em beneficio da terapeutica do tetano, ou pelo menos na prevenção dessa doença.

Não passou tambem despercebida a possibilidade de serem explicados, atravez da ação inibidora do *Cl. sporogenes*, certos fenomenos até hoje obscuros da biologia do bacilo do tetano, como sejam a existencia de variedades ou formas atoxicas e a impunidade dos individuos em cujo canal intestinal ele é encontrado.

Ampliando o campo de observações pelas experiencias aqui relatadas, tivémos, portanto, primeiramente o escopo de determinar si o

fenomeno da inibição da toxinogenese pelo *sporogenes* era de natureza individual e restrita, ou si amplo e especifico.

Experiencias feitas neste sentido deixaram suficientemente demonstrado que a inibição da toxinogenese ocorre de um modo geral para todas as amostras toxigenas da especie *Clostridium tetani* e que tambem todas as amostras da especie *sporogenes* são providas da faculdade de provoca-la. Alem disso, pôde ficar indicado que a especie *putrificus* participa da mesma propriedade.

Outras experiencias tendentes a dar uma impressão da sequencia de produção da substancia inibidora e da medida de sua atividade, permitiram estabelecer a fase da mais forte concentração dessa substancia inibidora nas culturas de *Clostridium sporogenes,* que foi determinada estar entre a 18.ª e a 120.ª horas de cultura. Tornaram-se aqui aparentes dois fatos novos: quando no maximo de sua atividade inibidora da toxinogenese, a cultura de *sporogenes* dá indicação de possuir também, em certo gráu, a capacidade de perturbar a vegetação do *Clostridium tetani;* e com o prolongamento da estadia da cultura de *sporogenes* em estufa a 37.°C, o teor da substancia inibidora parece sofrer queda; não podendo esta queda ser devida á ação da temperatura da estufa, torna-se provavel que o proprio *Cl. sporogenes* goze da propriedade de destruir a substancia antes formada.

A atividade da substancia inibidora presente numa cultura de *Cl. sporogenes,* na sua 72.ª hora, pôde ser determinada grosseiramente. Ela é de tal ordem que a presença de 0,4% do filtrado de cultura de *sporogenes* já confere ao substrato habitual uma ação inibitoria, embora fugaz e insuficiente, sobre a toxinogenese tetanica. Na proporção de 10% este filtrado inibe a toxinogenese até o 5.° dia de cultura, mas não até o 10.° dia, quando mesmo as culturas em filtrado natural se apresentam levemente toxicas.

Como consequencia destas experiencias pôde-se deixar evidenciado que quando a concentração da substancia inibitoria é baixa, apenas se observa perturbação da toxinogenese, estando a latitude dessa perturbação relacionada com o conteudo em inibidor. Assim, o fenomeno não se estabelece de repente e em massa, mas progride na razão direta do teor de inibidor e do tempo de cultura do *Clostridium tetani.*

A possibilidade de explicar a existencia de amostras atoxicas de *Cl. tetani* pela ação prolongada do *Cl. sporogenes* ou de seu fator inibidor provocou algumas verificações que, entretanto, deixaram indicada a improbabilidade de tal explicação. Logo que libertadas da presença imediata do inibidor, as amostras de bacilo do tetano origi-

nalmente toxigenas voltam a produzir toxina com a mesma intensidade anterior.

A ação do *sporogenes* se faz sentir diretamente, perturbando em maior ou menor gráu o mecanismo de formação de toxina; não ha transformação desta em toxoide, seja imediatamente após formada, seja durante o processo de formação.

Algumas experiencias foram tambem efetuadas no sentido de avaliar o comportamento do agente inibidor, em face de algumas condições supostamente adversas. Com isso pretendeu-se fornecer as primeiras contribuições para o conhecimento da natureza dessa substancia. Foi possivel verificar que temperaturas até 95°C, atuando durante 30 minutos, assim como acidez e alcalinidade expressas pelos pH 4,5 e 9,3, atuando durante 24 horas a 37°C, são incapazes de provocar a destruição desta substancia inibidora, quando dissolvida no substrato original e na concentração natural.

Ao Dr. Vitor Carneiro, que gentilmente reviu os originais, e a Renato Lion de Araujo, pelo auxilio prestado na redação do "abstract", apresentamos aqui nossos agradecimentos.

CONCLUSÕES

1) — A substancia inibidora da toxinogenese tetanica que se forma nas culturas de *Clostridium sporogenes* aparece entre a 12.ª e a 18.ª horas, mantendo-se em nivel elevado até o 5.º dia. Daí em diante a atividade da cultura declina ligeiramente.

2) — Filtrado de cultura de 72 horas de *Clostridium sporogenes* é capaz de provocar inibição total da toxinogenese tetanica, até o 5.º dia de cultura deste, mesmo quando sua concentração no substrato seja 1/10 da natural. Quando na proporção de 0,08%, este filtrado ainda tem ação perceptivel, embora ligeira, manifestando-se pelo retardamento e pela pequena potencia da toxina formada. Deixado vegetar durante 10 dias, o *Clostridium tetani* é capaz de formar pequena quantidade de toxina, mesmo si vegetando em filtrado puro de *sporogenes*.

3) — Em seu veiculo natural o agente inibidor é aparentemente insensivel á temperatura de 95°C, mantida durante 30 minutos e a concentrações de ions de hidrogenio correspondentes ao pH 4,5 e 9,3, mantidas durante 24 horas e a 37°C.

4) — 13 amostras de *Clostridium tetani* experimentadas, abrangendo os tipos sorologicos I, II e III, e na maioria fortemente toxigenas mostraram-se igualmente sensiveis ao fator de inibição do *Clostridium sporogenes.*

5) — 9 diferentes amostras de *Clostridium sporogenes,* verificadas quanto á sua capacidade para produzir o inibidor, mostraram-se todas ativas. Igualmente ativa se demonstrou uma amostra de *Clostridium putrificum.* De 4 amostras de *Clostridium bifermentans,* tres demonstraram um efeito retardador sobre a toxinogenese tetanica; uma outra foi inativa. *Cl. botulinum, Cl. parabotulinum, Cl. cochlearium, Cl. tertium* e *Cl. multifermentans* demonstraram-se inativos.

6) — A inibição da toxinogenese tetanica pelo filtrado de cultura de *Clostridium sporogenes* é um efeito transitorio, estritamente dependente da presença do agente inibidor na cultura.

7) — A toxina tetanica não é transformada em toxoide. Tambem não é produzido primariamente toxoide, sob a influencia do agente inibidor.

ON THE INFLUENCE OF *CL. SPOROGENES* UPON TETANUS TOXIN PRODUCTION

Abstract

It has been recently shown that Cl. sporogenes is able to inhibit tetanal toxinogenesis.

The results of some researches aiming at clearing up this phenomenon and its better delimitation are here presented.

It was found that types I, II, and III of Cl. tetani are equally sensitive. Furthermore, many other strains, not classified into types, also proved to be sensitive.

All of the tested sporogenes strains, as well as a strain of Cl. putrificum, were found to possess inhibitory capacity.

Clostridia bifermentans, parabotulinum, botulinum, cochlearium, multifermentans and tertium are devoid of inhibitory capacity.

Highest inhibitory capacity of cultures of Cl. sporogenes was recorded after the 18th hour and before the 120th hour of development. When the concentration of the inhibitor attains its maximum, the filtrate of the culture is, to a certain extent, also able to hinder the proliferation of Clostridium tetani.

Cl. sporogenes cultures over 120 hours old lose some of their inhibitory capacity.

The activity of the filtrate of 72 hours old cultures of Cl. sporogenes was roughly measured. It was shown that at a concentration of 0.4% this filtrate was able to induce a certain small and brief activity on the normal substrata. At 10% concentration, it induces a very strong activity.

The prolonged influence of Cl. sporogenes filtrate on Cl. tetani does not induce any lasting alteration in the toxin production mechanism. As soon as the latter is no longer under the influence of the sporogenes filtrate, it resumes its toxinogenesis. As a consequence, it is not possible to explain the existence of atoxic strains of Cl. tetani by a prolonged influence of the metabolic products of Cl. sporogenes.

The atoxic cultures obtained by cultivating Cl. tetani in Cl. sporogenes filtrates do not possess any toxoid, nor do they neutralize the specific antitoxin.

The inhibiting agent produced by Cl. sporogenes is heat-stable, being not affected by temperatures up to 95°C for half one hour. It is also insensitive to moderate acidity and alkalinity.

BIBLIOGRAFIA

BÄCHER, St., R. KRAUS e E. LÖWENSTEIN — 1925 — Zur Frage der aktiven Schutzimpfung gegen Diphterie. *Ztschr. f. Immf. u. exp. Therapie*, 42: 350-369.

CAILEY — 1917 — Citado por Tulloch em: *Journal of Hygiene*, 1919-1920, 18: 142-147.

RODRIGUES, C. e V. O. GUIDA — 1945 — Toxinogenese tetanica em culturas associadas. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 16: 193-216.

SORDELLI, A., F. MODERN e J. FERRARI — 1936 — La immunidad artificial contra el tetano. *Rev. Inst. Bacter.*, Buenos Ayres, 7: 623-661.

———o———

Vol. 17 — Art. 7 Novembro de 1946

PESQUISAS ACERCA DA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS VEGETAIS EM PLANTAS DA FLORA SUBTROPICAL

POR

M. Kramer e K. Silberschmidt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 20 figuras no texto e estampas 4-5

Uma nova era de pesquisas biológicas, resultante do intercambio entre a fisiologia vegetal e a quimica, a fitopatologia e diversos outros ramos da ciência, surgiu desde que, em 1928, WENT determinou a presença dos fitohormônios, auxinas ou hormônios do crescimento, nas plantas superiores.

Nesta nova fase as pesquisas sôbre tropismos, que vinham empolgando os botanicos da epoca, receberam novo impulso, e os trabalhos passaram a ser dirigidos em duas direções: numa parte deles — e aí se pode citar, entre nós, a contribuição de FAGUNDES (9, 1938) —, foi estudado o efeito do fornecimento de hormônios sintéticos ás plantas, enquanto outros autores se ocuparam exclusivamente com os hormônios formados, transportados e utilizados pela própria planta. Estudos desta ultima natureza foram realizados, até agora, quasi somente com representantes da flóra temperada, de modo que, afóra as investigações de ZIMMERMAN (35, 1942-1943), VAN OVERBEEK e colaboradores (31, 1943-1944), desenvolvidas em Porto Rico, faltam ainda conhecimentos a respeito dos hormônios naturais das plantas da flóra tropical ou subtropical. Por isso resolvemos iniciar estudos sôbre a produção dos hormônios do crescimento em diversos representantes da flóra brasileira. Pretendemos apresentar, neste trabalho, algumas observações relativas aos centros de produção dessas substancias em plantas lenhosas e herbaceas da zona subtropical, á periodicidade da produção dessas substâncias do crescimento nessas plantas e ao comportamento de representantes da nossa flóra e de plantas provenientes de outras zonas mais aclimadas no Estado de São Paulo.

Ao Sr. Joaquim F. Toledo, pela identificação das plantas, ao Sr. Anderson C. Andrade, pelas sugestões e pelo calculo estatistico, e á Sta. Ernestina Margarida Lima, pela execução dos desenhos, os autores consignam aqui os seus agradecimentos.

HISTÓRICO

Vejamos aqui, num rapido esboço da literatura, como se dirigiram e aumentaram os nossos conhecimentos acerca do segundo tipo de pesquisas acima mencionado, isto é, as pesquisas sobre a formação, transporte e utilização das auxinas pelas próprias plantas.

Inicialmente, esses estudos visaram estabelecer a existencia espontânea dessas substancias em diferentes espécies de plantas, para poder decidir se elas são de ocurrência generalisada. Como já dissemos, estes estudos haviam versado até agora maior número de representantes da zona temperada do que da zona tropical ou subtropical. Destacamos, entre os primeiros trabalhos dedicados ao problema da ocurrência das auxinas nas plantas, as pesquisas de SÖDING (22, 1926) com *Heliopsis laevis* e as de VAN DER WEIJ (29, 1933), VAN OVERBEEK (30, 1933), CZAJA (7, 1934) e THIMANN e SKOOG (28, 1934), respectivamente com *Elaeagnus angustifolius*, com plantinhas de *Raphanus*, em diversas arvores incluindo *Aesculus Hippocastanum* e com *Vicia faba*. Com esses estudos ficou demonstrada a presença de hormônios do crescimento tanto em plantas herbaceas como em lenhosas.

Mais tarde e fazendo uso de outros métodos, outros autores tambem contribuiram com mais dados experimentais a esse respeito. Por exemplo, GUSTAFSON (11, 1939 a), nos E. Unidos, empregou um método de extração completa, comparando o conteúdo de substâncias do crescimento de certas variedades, parthenocarpicas ou não, de laranjas, limões e uvas; e LEFÈVRE (17, 1938 e 18, 1939), na França, trabalhou com um método de coloração, dosando a presença normal do acido 3-indol-acético (*heteroauxina*) em plantas de couve-flôr, repolho, beterraba, cebola, cenoura, etc.

Muitos dos referidos autores, porém, não se contentando com a simples verificação da existencia desses hormônios de plantas, quizeram esclarecer ainda quais os orgãos que agiam como centros principais da produção dessas substancias. Tais problemas foram abordados, entre outros, nos trabalhos de CZAJA (7, 1934), THIMANN e SKOOG (28, 1934), LAIBACH e MEYER (16, 1935) ZIMMERMANN (34, 1936), SÖDING (25, 1936) e AVERY, BURKHOLDER e CREIGHTON (1, 1937 a). O resultado geral dessas pesquisas pode-se depreender de um resumo de AVERY (3, 1940), que friza que centros de produção de hormônios de crescimento nas plantas superiores são todas as partes meristemáticas, onde o novo protoplasma está sendo sintetizado, isto é, extremidades das hastes, as pontas das raizes, as fôlhas embrionárias e o cambio. Depois da publicação desse resumo, apareceram ainda novos trabalhos, como por exemplo o de GUSTAFSON

(13, 1946) em que se verificam as influências da adubação, temperatura, iluminação e parasitismo por Cuscuta, no teor de hormônios de plantas de tomate, milho, etc., trabalhos que confirmaram, em todo caso, as referidas conclusões de AVERY e dos demais autores.

Deixamos de citar e comentar aqui, propositadamente, a literatura mais referente á ação das flôres, frutos e sementes, como outras tantas fontes de produção de fitohormônios, por tratarmos disso mais adiante, em capitulo à parte.

Pois bem, alguns daqueles autores que se dedicaram á verificação dos centros de produção de hormônios nas plantas já ampliaram seus estudos no sentido de acompanhar as flutuações no teor dessas substâncias durante uma parte do ciclo da vida da planta. Verificaram, assim, que as referidas flutuações estão relacionadas, de um lado com a sequência das estações do ano, e de outro, com as diversas fases ontogenéticas da própria planta e dos seus orgãos. Estudos desta ultima natureza foram particularmente executados por LAIBACH e MEYER (16, 1935) com *Zea mays* e *Helianthus annuus* e MEYER (20, 1936), que além das duas citadas plantas se utilizou também do *Aesculus Hippocastanum, Picea excelsa* e tomateiro. ZIMMERMANN (34, 1936) e também posteriormente SÖDING (26, 1937 e 27, 1938) forneceram informações adicionais sôbre a distribuição periodica dos hormônios em diversas plantas lenhosas de clima temperado. BENNETT e SKOOG (5, 1938), por sua vez, contribuiram com determinações em botões dormentes de pereiras e macieras.

Apezar de muitos destes autores já terem feito, durante esses estudos, observações concernente á influência que, no curso do desenvolvimento ontogenético, a floração e a frutificação exercem no teor de hormônios da planta, esta questão não ficou ainda definitivamente esclarecida. As informações que aqui nos interessam encontram-se nos trabalhos de MEYER (20, 1936), AVERY, BURKHOLDER e CREIGHTON (1, 1937 a), SÖDING (26, 1937 e 27, 1938), GUSTAFSON (11 e 12, 1939 *a* e *b*) e WITTVER (33, 1943). A maioria dessas contribuições trata de métodos de extração completa, não de flôres ou frutos completamente desenvolvidos, mas geralmente de partes e fases definidas do desenvolvimento desses orgãos, empregando, além isso, plantas que não apresentam diferença nitida entre os periodos vegetativo e de florescimento.

MATERIAL E MÉTODO

As plantas incluidas nos estudos dos outros autores não são, geralmente, as que foram aproveitadas nos nossos ensáios experimentais. A escolha do nosso material obedeceu a outro critério,

especialmente á necessidade de se fazer uso de especimens típicos da nossa vegetação. Em certos casos, porém, tivemos oportunidade de comparar o teor de hormônios das plantas utilizadas pelos outros autores, com o de plantas características da zona temperada mas aclimadas ao nosso meio. Dentre essas plantas extrangeiras, que nos serviram de comparação, citamos o *Populus nigra* L. var. *italica* (MOENCH) DU ROI (Choupo preto) e o *Salix babylonica* L. (Salgueiro ou Salgueiro-chorão), que raramente perdem aqui todas as fôlhas no outono e inverno e são usadas principalmente na ornamentação de parques e jardins.

Para observar o comportamento de plantas néotropicais, em confronto com o de plantas de clima temperado introduzidas no Brasil, utilisamo-nos do *Tecoma ochracea* CHAM. (Ipê amarelo), que se despe das fôlhas no inverno, florescendo na entrada da primavera e da *Erythrina speciosa* ANDR. ("Canivete"), que forma flôres escarlates que se desenvolvem no meio do inverno, quando a arvore está geralmente desfolhada. Com este último tipo de ensáio quizemos contribuir para a elucidação de alguns detalhes do mecanismo hormonal, eventualmente estabelecido entre o periodo vegetativo e o periodo de florescimento das plantas.

Além das citadas, mais as seguintes plantas foram também usadas nestas experiências: *Ficus retusa* L. = *F. Benjamina Auct. bras. non* L. e *Ficus Roxburghii* (Figueiras de jardim); *Euphorbia pulcherrima* WILLD. (Flôr de papagaio); *Manihot utilissima* POHL (Mandioca); *Brassica campestris* L. (Mostarda); *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Mimo de Venus ou rosa da China); *Hibiscus* sp. aff. de *rosa-sinensis; Abutilon striatum* DICKS e *A. striatum* DICKS var. *spurium* LINCH. ("Campainhas" ou "benção de Deus"); *Chorisia speciosa* ST. HIL. (Paineira); *Pittosporum undulatum* VENT. ("Incenso"); *Tibouchina Sellowiana* COGN. e *Tibouchina urceolaris* COGN. (Quaresmeiras, Flôr de quaresma ou Jacatirão); *Bougainvillea glabra* CHOISY ("Primavera" ou "três Marias"); *Magnólia grandiflora* L. e *Magnólia liliflora* DESR. (Magnólias branca e roxa); *Jacaranda ovalifolia* R. BR. = *J. mimosaefolia* D. DON. (Jacarandá mimoso ou Caroba guassú); *Mimosa asperata* L. (Espinheiro); *Calliandra Tweediei* BENTH. e *C. purpurea* (WILLD.) BENTH. ("Diadema", Mandaravé ou "Quebra foice"); *Citrus aurantium* L. e *Citrus sinensis* (Laranjeiras azeda e doce); *Plumeria rubra* L. (Jasmim manga); *Eucalyptus acmenioides* SCHAUER (Eucalipto); *Solanum tuberosum* L. (Batatinha); *Datura stramonium* L. (Figueira do inferno); *Nicotiana tabacum* L. (Fumo); *Epidendron cinnaba-*

rinum SALZM. (Flôr do divino ou "Boca de dragão"); *Pelargonium zonale* L. hibrido (Pelargônio) e *Rosa* sp. var. Frau K. Drusky (Roseira).

Na determinação da presença dos hormônios nas partes das plantas adotamos, como técnica geral, o método desenvolvido por WENT, das curvaturas de coleoptiles de aveia. Nesta técnica, descrita (WENT, 32, 1928), os orgãos da planta em estudo são colocados sôbre placas de agar de 3%; os hormônios difundem-se no agar, após o que este é cortado em pequenos blocos, cada um dos quais é posto em contato, unilateralmente, com uma coleoptile decapitada de aveia; o hormônio, aplicado a um dos lados do topo da coleoptile, é conduzido neste lado para baixo, acelerando o crescimento justamente deste lado. Assim, esse crescimento unilateral resulta numa curvatura da coleoptile da aveia, curvatura cuja intensidade pode ser usada, dentro de certos limites, para avaliar a concentração da substancia de crescimento no material submetido á dosagem.

Pelas razões apontadas adiante, utilisamo-nos, porém, nos nossos estudos, não da técnica original desenvolvida por WENT, mas de um método simplificado, modificado por SÖDING (24, 1935), no sentido de dispensar o uso de um quarto escuro, de temperatura e umidade controladas.

No método clássico de WENT as plantinhas de aveia utilisadas no teste são cultivadas geralmente na ausencia da luz, ou então sob luz fototropicamente inativa, mas sempre em quartos mantidos numa temperatura de 25° C e numa umidade relativa de 88-90%. No método de SÖDING, em que não se visa naturalmente tamanha exatidão, não se necessitam condições externas tão bem controladas, uma vez que este método permite trabalhar em plena luz do dia. Démos preferência a este último método porque, na sala de que dispuzemos para estas pesquisas, no edificio principal do Instituto Biológico em São Paulo, as variações de temperatura e de umidade eram pouco acentuadas durante o periodo em que executamos as experiências. Além disso, a aplicação do teste foi favorecida pela iluminação difusa do laboratorio.

As diversas fases do método de SÖDING, adatado ás nossas condições, acham-se representadas, na forma de um diagrama, na fig. 1.

Passamos a dar agora uma descrição rapida do método, antes de apresentar as modificações que introduzimos para a sua execução propriamente dita nas nossas condições.

As sementes das aveias, previamente descascadas, são embebidas em agua de torneira durante 2 horas e em seguida colocadas por

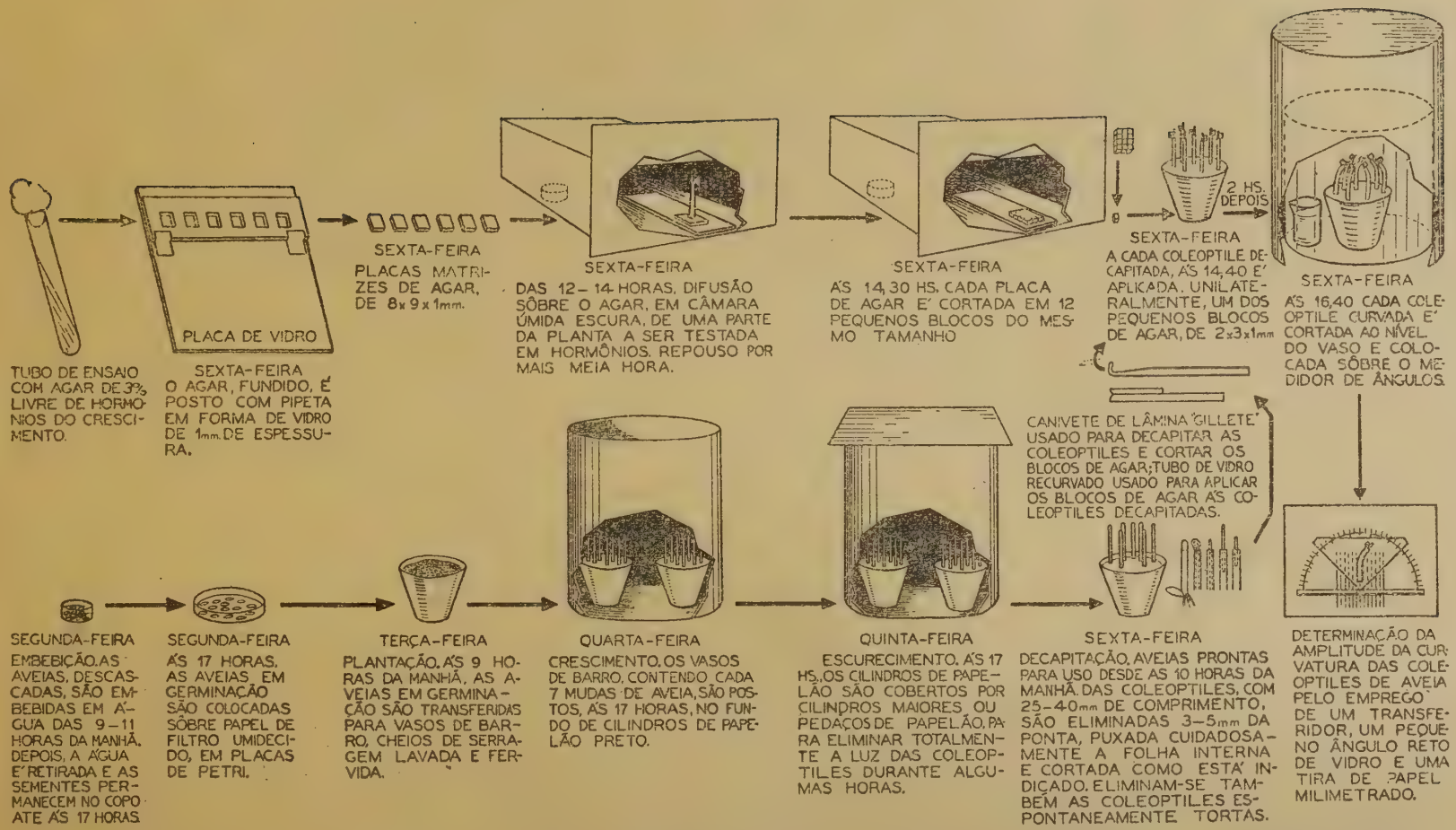


Fig. 1 — Diagrama das várias etapas do método de WENT, modificado por SÖDING e adatado ás nossas condições, para a determinação quantitativa de hormônios do crescimento

algumas horas em placas de Petri sôbre papel de filtro umidecido, no laboratório, com temperatura, umidade e luz normais, mas isento de gazes toxicos. No dia seguinte as sementes são plantadas em pequenos vasos de barro de 6,5-7,5 cm de diametro, cheios de serragem de madeira umida, lavada e fervida. O plantio, feito em circulo fechado, é de cerca de 7 sementes por vaso. Os vasos são depois transportados para o interior de cilindros altos, de papelão preto, de 45 cm de altura por 20 cm de diametro, fechados numa das extremidades. No fundo fechado desses cilindros as mudinhas crescem durante 2½-3 dias, na temperatura normal do laboratório, recebendo luz apenas de cima, afim de se obterem coleoptiles bem eretas e estioladas. Algumas horas antes da experiência, no minimo 8 horas, os cilindros contendo os vasos de barro são cobertos por fôlhas de papelão, de maneira a vedar completamente a luz ás mudinhas, tornando-as assim mais sensiveis ao teste. Quando as coleoptiles atingem 3 cm de altura, estão, de acordo com a pratica usual nestas determinações, prontas para serem usadas no teste. Dos vasos, retirados individualmente do fundo dos cilindros, são então decapitadas cerca de 0,5 cm das pontas das plantas, e as fôlhas primarias que se encontram no interior das coleoptiles são arrancadas da base e puxadas para cima. Nesta ocasião os pequenos blocos de agar, de tamanho padronisado e contendo o hormônio a ser provado, são aplicados á superficie cortada, em um lado das coleoptiles, sôbre uma nervura, como já foi descrito por WENT e outros.

O preparo completo de cada vaso leva aproximadamente 10 minutos. Os vasos, com as mudinhas preparadas, são então dispostos sob cubas de vidro, invertidas, de 25 cm de altura por 19 cm de diametro, juntamente com um pequeno copo da Boemia, de 4,5 cm de diametro, contendo cerca de 50 centimetros cubicos de agua quente a 60° C, sendo todo o conjunto, por sua vez, coberto por um daqueles cilindros de papelão preto. Após 120-150 minutos da aplicação dos blocos de agar já se pode efetuar a medição dos gráus de curvatura (estampa 4, fig. *B*).

As curvaturas, produzidas pela aplicação unilateral dos hormônios, podem ser medidas com um tipo de goniometro descrito por SÖDING (23, 1934) (estampa 4, fig. *A*). Consiste ele de um transferidor de celuloide, a cujo centro marcado se aplica uma lamina de vidro cortada em angulo reto; em baixo do transferidor dispõe-se uma tira de papel milimetrado. Para medir a curvatura, cada coleoptile de aveia é cortada pela base e colocada sôbre a lamina de vidro, á qual se imprime uma rotação até que uma das extremidades

da coleoptile fique paralela ás linhas do papel milimetrado: anota-se, nessa ocasião, o número de gráus marcado no transferidor. Gira-se então a lamina de vidro novamente, até que a outra extremidade da aveia fique tambem paralela ás linhas do papel milimetrado e de novo se anota a graduação: a diferença de graduação entre as duas leituras dá a medida da curvatura da coleoptile.

Para a pratica desse método nas nossas condições introduzimos algumas modificações e adaptações simples, que passaremos a enumerar. As aveias de que nos utilisamos como material indicador dos hormônios não eram da variedade *siegeshafer* comumente empregada, mas sim da linhagem 66, proveniente da Estação Experimental "Alfredo Chaves", do Rio Grande do Sul e obtida por gentileza da Seção do Fomento Agricola Federal em São Paulo. Esta variedade se mostrou adatada ao teste, por mostrar bom poder germinativo e uniformidade de crescimento. A sensibilidade destas aveias correspondeu a curvaturas de uma média de 16,5° quando provadas com blocos de agar embebidos numa solução aquosa de 1 miligrama por litro de acido 3-indol-acético (*Heteroauxina*, Hoffmann — La Roche).

O tamanho dos blocos de agar, aplicados unilateralmente, era de 2 x 3 x 1 milimetro. Esses blocos eram obtidos pela divisão, em 12 partes iguais, de placas matrizes de 8 x 9 x 1 milimetro. O agar a 3%, previamente bem lavado durante 24 horas em agua corrente, para eliminação de traços de hormônios eventualmente existentes nas fibras do agar, era esterilizado, fundido e derramado em moldes originais, do tamanho das placas matrizes. Para a confeção desses moldes ou fôrmas juntamos tiras de vidro por meio de esparadrapo (estampa 4, fig. *A*). Depois do agar estar relativamente frio nas fôrmas, passava-se por cima, para retirar o excesso, um pequeno canivete, adatado de lamina de barba "Gilete". O mesmo tipo de canivete utilisavamos depois para cortar as placas matrizes de agar nos pequenos blocos e para decapitar as aveias.

A técnica de uma unica decapitação das aveias foi a que seguimos.

Para a movimentação e colocação dos pequenos blocos de agar nas coleoptiles decapitadas idealisamos também pequenos bastonetes de vidro, com ponta recurvada em angulo reto, aos quais, por coesão, o agar adere bem, sem rutura nem destruição dos angulos de córte (est. 4, fig. *A*).

Realizamos a difusão normal dos hormônios, dos orgãos das plantas estudadas para o agar, no interior de camaras umidas escurecidas, de 20 x 15 x 7 cm de altura ou de 12 x 10 x 5 cm de altura,

conforme o tamanho do material (est. 4, fig. *A*). Tanto os blocos de agar simples, usados como testemunhas, como os que continham já o hormônio, eram conservados sôbre laminas de vidro, no interior das referidas camaras umidas escurecidas, até o momento de serem aplicados no teste.

O tempo de difusão do hormônio nas placas de agar foi, no minimo, de 2 horas, e, no máximo, de 4 horas.

Para facilitar a difusão vertical do hormônio a partir de galhos e peciolos, idealisamos um simples aparelho de corrediça, de 7,5 cm de comprimento por 6 cm de largura e 3 cm de altura, constituido de duas gavetas de madeira: na base e no apice de cada gaveta existiam duas cisuras. Na cisura da base inseriamos a lamina de vidro contendo as placas matrizes de agar simples, e na de cima inseriamos laminas de celuloide, guarnecidas por faixas de aluminio, laminas essas dotadas de perfurações de tamanho variavel e que davam passagem ás hastes (est. 4, fig. *A*).

Na obtenção dos hormônios seguimos a técnica da difusão espontânea, em duas modalidades: difusão natural de orgãos inteiros e difusão natural de raspagens de cambio.

Nos ensaios sôbre difusão natural de hormônios de orgãos inteiros, estudamos o teor destas substancias nas diversas partes intactas das plantas, tais como brotos, galhos, peciolos, fôlhas, flôres e frutos. Nestes ensaios os brotos e galhos utilizados eram geralmente novos. No laboratório este material era lavado, enxuto cuidadosamente e depois cortado em pedaços pequenos, de cerca de 3 cm, para serem aplicados de pé sôbre as placas matrizes de agar. De cada pedaço de haste preparavam-se, tanto quanto possivel, 3 partes, uma correspondente à base, outra à parte mediana e a terceira ao apice desses orgãos. Quando esses orgãos mediam espontâneamente cerca de 4 cm de comprimento, como no caso do começo da brotação da primavera, eram deixados inteiros, dando apenas um córte reto em baixo, para o pedaço da haste aderir bem à superficie do agar. Depois do tempo de difusão, os pedaços de hastes eram eliminados, do mesmo modo que as partes do agar correspondentes tanto à zona central como ao excesso do diametro do orgão.

Em alguns ensaios, feitos com fôlhas ou flôres, a difusão natural das substancias do crescimento foi tentada a partir dos peciolos foliares, dos peciolos florais ou também colocando-se diretamente a base de fôlhas ou flôres novas sôbre as placas de agar.

No estudo com frutos foi tentada a difusão natural de frutos inteiros cortados pela base.

Nos ensaios de difusão a partir de cambio utilisamo-nos geralmente de galhos de cerca de 40 centimetros de comprimento e 1 cm de diametro na base, retirados da parte mediana ou proximo da parte apical das plantas. No laboratório esse material era lavado, eliminando-se, a seguir, a extremidade desses galhos, de diametro inferior a cerca de 0,5 cm, devido á dificuldade de trabalhar com material de menor diametro. Da parte restante, retirada a casca por meio de um bisturí, fica exposta uma zona de tecido novo, meristemático, geralmente mole e de côr clara, que é o cambio ou camada geradora, a qual, de acordo com a literatura, mostra-se rica em auxina.

Desta zona do cambio, e dos tecidos adjacentes, fizemos então raspagens até encontrar resistência, oferecida pelo lenho, de tecido mais rijo e geralmente de côr esbranquiçada, amarelada ou escura. O tecido raspado, comumente úmido ou, quando sêco, aglutinado por meio de umas gotas de agua distilada, era aplicado sôbre o agar. Em seguida todo o conjunto da pasta do cambio, comprimida como um ladrilho e sobreposta ao agar, era mantido dentro daquelas camaras umidas escurecidas, já referidas á pag. 8, pelo prazo médio de duas horas. Depois a pasta era eliminada e cada placa de agar era dividida nos 12 pequenos cubos, sendo daí em diante todas as demais fases identicas ás do nosso método padrão.

Exporemos em seguida os resultados obtidos em todos estes nossos ensaios, executados com material de plantas sadias, de campo, e que se extenderam consecutivamente durante o periodo de pouco mais de 1 ano (17/8/1944-22/11/1945). Alguns ensaios preliminares, feitos também antes de Agosto de 1944, serviram á aquisição da pratica necessaria ao emprego rapido do método de determinação dos hormônios.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Com o objetivo de expôr as varias modalidades das experiências levadas a efeito, adotaremos a ordem seguinte na apresentação dos dados: trataremos primeiro, englobadamente, dos casos de obtenção de hormônios pela difusão natural de orgãos inteiros; depois apresentaremos os resultados totais obtidos com a difusão de tecido macerado de cambio; e a seguir passaremos aos resultados parciais, referentes à influencia da folhagem, da idade do galho e da floração. Reservamos para o fim as observações sôbre a periodicidade da produção dessas substâncias do crescimento.

1) ESTUDOS EXECUTADOS COM ORGÃOS INTEIROS DE PLANTAS

a) Difusão natural de brotos, galhos, peciolos, fôlhas, flôres e frutos.

Para detalhes quanto ás técnicas empregadas nestes estudos, vide pag. 107. Os resultados gerais dos ensaios feitos com estes orgãos estão representados na tabela 1. Como se trata de um estudo com orgãos diferentes, cujos resultados não são perfeitamente comparaveis entre si, deixamos de apresentar aqui dados numericos. Para facilitar a compreensão desta tabela, porém, dispuzemos em grupos as plantas que não produziram curvaturas nas aveias (0), as que deram curvaturas duvidosas (±), as que as deram fracas (+), as que produziram reações medias (++) e as que mostraram fortes curvaturas (+++). Tais sinais convencionais, que adotamos, foram selecionados dentre os casos mais tipicos de cada material, em que se fez uso dos orgãos mais adequados.

Como se vê na coluna dos resultados da tabela 1, os orgãos inteiros mais amplamente estudados e que de fato provaram ser os mais favoraveis a estes estudos, foram os brotos novos. Aliás este resultado era de esperar, pois já existem muitas indicações da literatura (AVERY, BURKHOLDER e CREIGHTON, 1, 1937 a, p. 53 e SÖDING, 27, 1938, p. 427) a respeito de um teor relativamente elevado dos brotos em hormônios do crescimento.

Na referida tabela 1 distribuimos a totalidade das plantas examinadas, de acordo com o provavel teor dos brotos em hormônios, em 5 grupos. Vejamos agora os casos mais típicos de cada grupo.

No primeiro grupo, das plantas cujos brotos não difundiram hormônios capazes de provocar curvaturas nas coleoptiles de aveia, podemos tomar como exemplo a especie ornamental *Ficus Roxburghii*, que na experiência executada em 2/1/45 deu 0° de curvaturas num total de 16 aveias provadas.

No grupo das plantas incluidas entre as reações duvidosas, tivemos o *Salix babylonica*, que na experiência de 12/3/45 produziu duas curvaturas pequenas, de 4° cada uma, dentre 17 aveias provadas com bases de brotos novos, ao passo que, na mesma data, obtivemos 0° de curvaturas dentre 9 outras plantas de aveia provadas com outros pedaços de brotos.

No grupo das plantas cujos brotos deram curvaturas fracas, encontramos a especie *Ficus retusa*, planta ornamental muito usada como cerca viva. Com material desta espécie ás vezes obtivemos curvaturas relativamente elevadas e outras vezes, não. Por exemplo, na série executada em 6/9/44, em que empregamos 20 coleoptiles de

TABELA 1

Distribuição de auxina em orgãos de diferentes plantas

Orgãos ensaiados	Plantas experimentadas	N.º de ensaios	N.º de aveias		Resultados convencionais
			Tratadas	Curvadas	
Brotos novos	*Ficus Roxburghii*	1	16	0	0
» »	*Manihot utilissima*	2	25	0	0
» »	*Hibiscus rosa-simensis*	1	26	0	0
» »	*Tibouchina Sellowiana*	1	16	0	0
» »	*Tibouchina urceolaris*	1	11	0	0
» »	*Pelargonium zonale*, hibrido	1	9	1	±
» »	*Eucalyptus acmenioides*	1	12	2	±
» »	*Salix babylonica*	1	26	2	±
» »	*Euphorbia pulcherrima*	4	63	13	+
» »	*Ficus retusa*	3	67	9	+
» »	*Datura stramonium*	3	77	11	+
» »	*Nicotiana tabacum*	3	64	9	+
» »	*Magnolia liliflora*	4	92	14	+
» »	*Magnolia grandiflora*	2	40	25	+ +
» »	*Solanum tuberosum*	2	74	31	+ +
» »	*Pittosporum undulatum*	1	14	13	+ + +
» »	*Bougainvillea glabra*	4	73	44	+ + +
» »	*Tecoma ochracea*	19	538	278	+ + +
Galhos maduros	*Ficus retusa*	1	19	0	0
» »	*Plumeria rubra*	1	21	0	0
» »	*Tecoma ochracea*	1	25	0	0
» "ladrão"	*Bougainvillea glabra*	1	25	25	+ +
Fôlhas	*Hibiscus rosa-sinensis*	1	9	0	0
»	*Nicotiana tabacum*	3	99	10	±
Peciolos foliares	*Hibiscus rosa-sinensis*	1	10	0	0
» »	*Tecoma ochracea*	2	26	11	+ +
Flôres	*Hibiscus sp. aff. de rosa-sinensis*	1	19	0	0
»	*Erythrina speciosa*	1	15	3	±
Peciolos florais	*Bougainvillea glabra*	1	21	0	0
» »	*Pelargoinum zonale*, hibrido	1	16	2	±
» »	*Plumeria rubra*	1	30	4	±
» »	*Epidendron cinnabarinum*	1	14	4	+
» »	*Erythrina speciosa*	1	30	22	+ +
Frutos	*Tecoma ochracea*	2	21	0	0
»	*Ficus retusa*	2	25	2	±
»	*Erythrina speciosa*	1	15	3	+

aveias e nos utilisamos de bases de brotos novos, obtivemos quatro aveias curvadas, abrangendo os valores de 5°, 16°, 18° e 20°; já com o mesmo tipo de material, numa série feita em 13/3/45, tanto com bases como com partes médias de brotos, os resultados foram 0° entre 12 plantas de aveia. Acreditamos que, especialmente com Euphorbiaceas e Moráceas, a difusão natural a partir de brotos seja bloqueada pelo latex que se coagula no interior dos vasos.

Tratando a seguir das plantas do quarto grupo, que por difusão de brotos produziram curvaturas que consideramos médias, exemplificamos com a batatinha *Solanum tuberosum*. Agar submetido á difusão de apice, parte média e base de broto novo deste material e provado de cada vez em 8 aveias, numa serie executada em 6/12/44, deu nas coleoptiles de aveia as seguintes medias de curvaturas: 6,3° com apice, 4° com a parte média e 1° com a base do broto, respectivamente (figs. 2 e 3).

Ao lado destes casos, temos agora o grupo de plantas que deu fortes curvaturas nas aveias. *Tecoma ochracea* foi, por exemplo, uma planta deste grupo, como indica a última linha da coluna de brotos novos, da tabela 1. Detalhando, podemos dizer que sempre que nos utilisamos de hastes novas desta espécie, retiradas de plantas que iniciavam a primeira brotação da primavera, os resultados foram geralmente bons, como podemos deduzir dos protocolos da experiência de 16/1/45. Nesta experiência empregamos apices de brotos novos e aí 14 coleoptiles de aveias deram as seguintes curvaturas, respetivamente: 0°, 2°, 6°, 6°, 8°, 8°, 8°, 8°, 8°, 9°, 9°, 10°, 14°, e 20°, o que dá uma média de 8,28°.

Outro resultado de nossas experiências, contido no segundo item da tabela 1, consiste numa acentuada diferença entre galhos grossos ou maduros e brotos novos, uma vez que só estes mostraram conter um elevado teor de fitohormônios. Efetivamente, nos nossos ensaios, hastes velhas ou mais duras geralmente não difundiram hormônios. Por exemplo, na mesma serie antes referida, de 16/1/45, pesquisando a difusão de hormônios de uma outra arvore de *Tecoma*, desta vez completamente brotada, verificamos que tanto a primeira brotação da primavera, como uma segunda brotação, tardía, deram 0° de curvaturas, ao se efeturam os testes em 12 e 13 coleoptiles de aveia, respetivamente.

Parece, porém, que quando a determinação é feita em galho "ladrão", de crescimento vigoroso, como se encontra frequentemente na *Bougainvillea*, pode-se obter também um elevado teor de hormônios. Isso é nitidamente exemplificado na experiência de 30/1/45, em que,

estudando galhos desta natureza, obtivemos 25 aveias curvadas dentre 25 experimentadas, com uma média total de curvaturas de 16,6°.

Comentando agora os demais resultados da tabela 1, observa-se que as fôlhas, flôres e frutos e os respetivos peciolos foram pouco estudados e mostraram encerrar geralmente pouco hormônio. Esta última consequência se deve provavelmente ao fato de havermos estudado esses orgãos numa fórma intacta e já completamente desenvolvidos (figs. 4 e 5). Das plantas incluidas nestes últimos agrupamentos destacamos, pelo maior conteúdo eventual de hormônios, a *Erythrina*, quando estudadas suas flôres, peciolos florais e frutos (figs. 6 e 7).

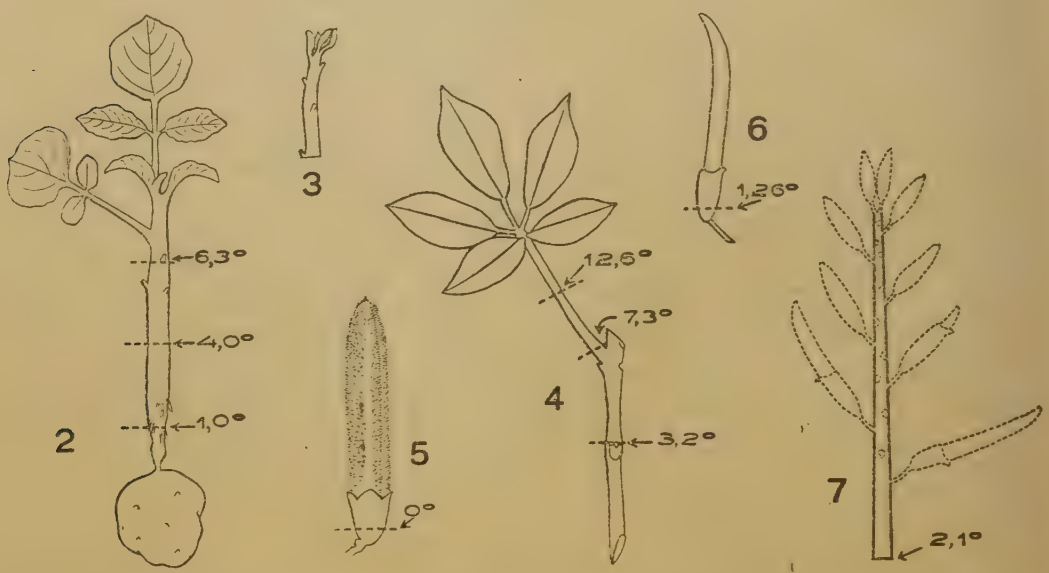


Fig. 2 — Conteúdo de hormônios no apice, parte média e parte basal de broto novo de *Solanum tuberosum*, expresso em gráus de curvatura de coleoptiles da aveia: Material de campo, exp. de 6/12/44. (½ do tamanho natural). Fig. 3 — Detalhe da parte estudada do apice de broto novo, de 3 cm de comprimento, de *Solanum tuberosum*. Fig. 4 — Exp. de 10/10/44: Pesquisa de hormônios no apice do peciolo foliar, na base do peciolo foliar e na base do broto novo, em pedaços de 3 cm de comprimento de *Tecoma ochracea*. (¼ do tamanho natural). Fig. 5 — Exp. de 18/10/44: Pesquisa de hormônios em frutos desenvolvidos e intatos de *Tecoma ochracea*. (½ do tamanho natural). Fig. 6 — Exp. de 14/8/45: Pesquisa de hormônios em flôres desenvolvidas e intatas, de *Erythrina speciosa*. (½ do tamanho natural). Fig. 7 — Exp. 25/7/45: Pesquisa de hormônios no eixo da inflorescência de uma planta de *Erythrina speciosa*. (½ do tamanho natural).

Na técnica de difusão normal a partir de brotos e demais orgãos intatos, experimentamos algumas dificuldades quanto á manutenção do contáto entre esses orgãos e o agar. Ocasionalmente os pedaços dos orgãos colocados sôbre o agar caiam antes do tempo, perfuravam-no pelo próprio peso, ou então desidratavam o agar.

Isso aconteceu principalmente com brotos mais grossos, maduros, ou galhos mais velhos. Devemos frizar, pois, que em alguns casos os resultados por nós obtidos estiveram sujeitos a variações que escaparam ao nosso controle. Por isso passamos a dispensar, daí por diante, maior atenção a outra técnica de aproveitamento do material para ensaios de difusão. Esta técnica consistiu no emprego de raspagens de cambio.

2) ESTUDOS REALIZADOS COM O MÉTODO DE RASPAGENS DE CAMBIO

a) Comparação dos resultados globais, obtidos com este método nas diversas espécies de plantas estudadas.

Fomos levados a aplicar este método diante das ligeiras discrepancias que notamos nos resultados da difusão natural dos orgãos intatos. Mas também levamos em consideração a necessidade de encontrar um processo pelo qual pudessemos, com mais facilidade, comparar ao mesmo tempo orgãos identicos de plantas diferentes, em diversos estados do desenvolvimento e em diferentes epocas do ano, fato que nem sempre seria possivel com a outra técnica.

Na parte de Material e Método, pag. 108, descrevemos a técnica aplicada nestes estudos. Com essa técnica fizemos os ensaios utilisando-nos ainda da maioria das plantas já experimentadas no estudo com brotos, e obtivemos os resultados gerais contidos na tabela 2. Nesta tabela, na coluna "periodo das observações" as datas simples indicam a epoca da execução do único ensaio, ao passo que as datas duplas representam a primeira e a última das observações feitas; se o número de ensaios foi maior do que 2, as demais datas da experimentação ficam subentendidas entre a primeira e a última das observações citadas. Na coluna dos resultados são dadas a média total das curvaturas e o seu erro, correspondentes a cada planta ensaiada. Esse erro, obtido segundo a formula $s = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$ indica a extensão de variação que pode ocorrer na média. Esta última foi calculada com os dados parciais, obtidos em todos os ensaios efetuados com a mesma planta.

Por esta tabela 2 verifica-se como é variavel o conteúdo de hormônios do crescimento, de planta a planta. *Ficus Roxburghii* e *Manihot utilissima,* que na difusão a partir de brotos não deram resultados, também não deram, ou mostraram resultados praticamente nulos com raspagens de cambio. *Pelargonium* e *Magnólia liliflora* (fig. 8) também se comportaram como plantas que difundem, provavelmente, muito pouca auxina livre por raspagem de cambio.

TABELA 2

Médias totais dos graus de curvaturas produzidos em coleoptiles de aveia pelas raspagens do câmbio do caule de diversas espécies de plantas

Plantas experimentais	N.º de ensáios	Período das observações	N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média
			Tratadas	Curvadas	
Ficus Roxburghii	2	10/10/44 - 2/1/45	60	0	0
Pelargonium zonale, hibrido	1	27/3/45	17	0	0
Magnólia liliflora	1	18/10/44	16	0	0
Manihot utilissima	3	28/3/44 - 27/3/45	54	4	0,41° ± 0,22°
Bougainvillea glabra	3	30/1/45 - 3/10/45	67	5	0,44° ± 0,16°
Hibiscus sp. aff. de rosa-sinensis	2	29/2/44 - 25/5/45	59	4	0,47° ± 0,19°
Citrus aurantium	1	19/3/45	21	2	0,52° ± 0,37°
Jacaranda mimosaefolia	4	20/10/44 - 12/10/45	82	13	0,86° ± 0,10°
Abutilon striatum var. *spurium*	2	27/2/45 - 26/3/45	37	7	1,08° ± 0,38°
Calliandra purpurea	3	31/8/44 - 28/8/45	57	11	1,28° ± 0,40°
Calliandra Tweediei	4	31/8/44 - 28/8/45	85	13	1,52° ± 0,52°
Citrus sinensis	4	14/3/44 - 30/8/44	159	31	1,81° ± 0,36°
Abutilon striatum	2	17/4/45 - 25/5/45	44	15	2,04° ± 0,60°
Brassica campestris	1	26/3/45	22	13	2,63° ± 0,68°
Chorisia speciosa	3	10/4/45 - 22/10/45	42	14	2,74° ± 0,77°
Erythrina speciosa	6	19/7/45 - 3/10/45	142	81	3,27° ± 0,36°
Tibouchina urceolaris	5	23/1/45 - 17/10/45	68	36	3,67° ± 0,55°
Ficus retusa	23	31/8/44 - 17/10/45	482	276	4,40° ± 0,24°
Hibiscus rosa-sinensis	3	9/1/45 - 30/5/45	66	51	4,78° ± 0,61°
Rosa sp.	1	13/3/45	21	18	4,95° ± 0,58°
Tecoma ochracea	16	2/10/44 - 22/11/45	389	246	5,15° ± 0,38°
Magnólia grandiflora	1	5/3/45	22	17	5,22° ± 1,23°
Euphorbia pulcherrima	9	9/1/45 - 18/10/45	208	124	6,10° ± 0,23°
Populus nigra	14	25/10/44 - 22/11/45	304	163	6,90° ± 0,43°
Tibouchina Sellowiana	9	27/2/45 - 22/11/45	154	99	7,38° ± 0,60°
Datura stramonium	1	26/3/45	12	11	9,00° ± 1,89°
Mimosa asperata	1	10/4/45	10	10	9,30° ± 1,27°
Pittosporum undulatum	4	30/8/44 - 13/7/45	60	55	9,30° ± 0,66°
Salix babylonica	13	21/11/44 - 12/10/45	287	238	10,43° ± 0,44°
Eucalyptus acmenioides	2	20/3/45 - 25/5/45	35	35	16,11° ± 0,99°

Vem em seguida um grupo de plantas, começando pela *Bougainvillea glabra* e entre as quais se inclue ainda o *Citrus aurantium* (laranja azeda) e *Jacaranda mimosaefolia*, com as quais obtivémos resultados baixos, por difusão de raspagem de cambio, em todas as séries levadas a efeito. Em uma destas plantas, a *Bougainvillea glabra*, defrontamo-nos mesmo com um resultado até certo ponto contraditório, em vista de haver esta espécie mostrado ser rica de hormônio, quando este foi obtido por difusão natural dos galhos novos e dos galhos "ladrão". A nosso vêr, a anomalia no comportamento da *Bougainvillea*, quando estudada por raspagem superficial do cambio, talvez tenha a sua explicação nas particularidades de formação do lenho e liber nesta planta (SCHENCK, 21, 1893 e HEIMERL, 15, 1934). Como em muitas outras Nyctaginaceas, o cambio primitivo, superficial, desta planta, não persiste durante toda a vida: formam-se mais para o interior do galho novos aneis, de maneira que, ao tirar-se a casca, encontram-se logo abaixo os restos de um cambio já sem atividade e, portanto, pobre em hormônios.

Os dois tipos de *Abutilon* (*A. striatum* e *A. striatum* var. *spurium*), as duas espécies de *Calliandra* (*C. purpurea* e *C. Tweediei*) e as laranjeiras doces (*Citrus sinensis*, var. Pêra e Baía) comportaram-se igualmente como plantas pobres de hormônio — pelo menos nas épocas em que foram feitos os exames —, não só quanto á concentração, expressa em graus de curvaturas de aveia, mas também em relação ao número de aveias que se curvaram, pois no maximo 30% delas reagiram.

No grupo de plantas com concentrações medianas de hormônio, destacamos *Chorisia speciosa, Erythrina speciosa, Tibouchina urceolaris* (fig. 9), *Ficus retusa* e *Hibicus rosa-sinensis* (fig. 10), com cujo material de raspagem de cambio, pelo menos 50% das aveias tratadas reagiram, com curvaturas típicas, si bem que não muito acentuadas.

Maiores concentrações, porém, expressas em termos de curvaturas de aveias, foram observadas em *Tecoma ochracea, Magnolia grandiflora* (fig. 11), *Euphorbia pulcherrima, Populus nigra, Tibouchina Sellowiana, Pittosporum undulatum, Salix babylonica e Eucalyptus acmenioides*. Com material destas plantas, praticamente 100% das aveias tratadas se curvaram, e no mínimo 60% delas reagiram com médias de curvaturas de 5°-16°.

Nos ensaios seguintes, a cuja descrição vamos passar agora, restringimo-nos a 7 dentre as espécies incluidas na Tabela 2. Trata-se das espécies *Erythrina speciosa, Ficus retusa, Tecoma ochracea,*

Euphorbia pulcherrima, Tibouchina Sellowiana, Populus nigra e *Salix babylonica,* que foram escolhidas por exibir um teor relativamente elevado de hormônios e por ter caracteres fisiológicos especiais. As vezes, porém, a titulo de comparação, incluimos ainda nestas observações alguns dados obtidos em diversas outras das espécies já mencionadas.

b) Influência da folhagem na concentração de hormônio no câmbio.

De acordo com as indicações da literatura, existe estreita relação entre as fôlhas e a formação dos hormônios de crescimento. Á referida conclusão chegaram VAN DER WEIJ (29, 1933), estudando os hormônios em fôlhas novas de *Elaeagnus angustifolius* e THIMANN e SKOOG (28, 1934) quando averiguaram que os botões terminais e os laterais de *Vicia faba* contêm muito hormônio durante a fase de crescimento ativo. Posteriormente, GOODWIN (10, 1937) observando o desenvolvimento foliar de algumas espécies de *Solidago, e* AVERY e POTTORF (4, 1945), analisando pontas de vegetação e fôlhas de couve, admitiram também que as fôlhas novas e principalmente os botões foliares e as pontas de vegetação produzem hormônio, que é depois conduzido para a haste. Segundo GOODWIN, a difusão torna-se praticamente insignificante quando as fôlhas atingem completa maturidade.

Dispondo, em nossa flora, de espécies de plantas em que, numa mesma época do ano, certos exemplares se acham providos de fôlhas, enquanto outros, devido á queda outonal delas ficam completamente desprovidos desses orgãos, achamos por isso interessante comparar, pelo método de raspagem do cambio, dentro da mesma espécie, plantas com e sem fôlhas.

Assim, câmbio de arvores com fôlhas e de arvores sem fôlhas foram pesquisados em seu conteúdo de hormônios, em diferentes ocasiões do ano. Os dados acham-se reunidos na Tabela 3. De cada ensaio foi calculada a média em termos de graus de curvaturas de coleoptiles de aveia, assim como o erro da média. Para o calculo do erro utilizamo-nos da mesma formula já referida á pag. 113.

Os dados da tabela 3 mostram claramente que o teor de hormônio livre está nitidamente relacionado com a presença de fôlhas. Há uma acentuada diminuição no teor de hormônio nas plantas desfolhadas, diminuição que pode atingir até 1/4 da concentração das plantas da mesma espécie, enfolhadas. É especialmente na *Erythrina* que estes resultados são mais perceptiveis.

As diferenças muito pouco marcadas que existem entre material com e sem fôlhas, nas experiências de 10/8/45 com o Ipê amarelo

TABELA 3

Determinações do teor de hormônios livre em cambio de caules, com e sem fôlhas, das espécies *Tecoma ochracea*, *Erythrina speciosa* e *Euphorbia pulcherrima*

Datas	Plantas experimentais	Plantas com fôlhas			Plantas sem fôlhas		
		N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média	N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média
		Tratadas	Curvadas		Tratadas	Curvadas	
2/10/44	Tecoma	...	...	....	33	25	3,51° ± 0,55°
3/10/44	»	17	17	9,64° ± 1,07°	18	12	6,00° ± 1,41°
9/10/44	»	24	24	9,66° ± 0,90°	...	...	... ...
10/8/45	»	16	4	0,93° ± 0,52°	11	2	0,81° ± 0,55°
17/7/45	Erythrina	17	11	4,64° ± 1,24°	19	2	1,00° ± 0,84°
24/7/45	»	17	15	4,82° ± 1,16°	18	8	2,33° ± 0,85°
25/9/45	»	16	15	5,81° ± 0,99°	12	4	1,41° ± 0,83°
8/8/45	Euphorbia	22	5	0,95° ± 0,43°	22	4	1,00° ± 0,69°
25/9/45	»	18	8	2,05° ± 0,71°	17	11	2,29° ± 0,66°

(*Tecoma*) e nas de 8/8 e 25/9/45 com a "Flôr de papagaio" (*Euphorbia*) explicam-se assim: o teor em hormônios do *Tecoma* enfolhado foi pesquisado, nesta série, em raspagem de cambio de galhos providos de fôlhas velhas e sem grande atividade, ao passo que na *Euphorbia* a falta de fôlhas somente é parcial, dado o fato de que, nesta época da floração, as fôlhas verdadeiras são substituidas até certo ponto pelas bracteas vermelhas, que aparecem junto com o cyatheo ou inflorescência na ponta dos ramos.

Estes resultados gerais, portanto, estão em certa concordancia com os obtidos pelos autores citados. Além da indicação de que nas 3 espécies de plantas estudadas é altamente provavel que as fôlhas ajam como centros de produção de hormônios para as hastes, estas nossas observações mostram também outro resultado, que vem a ser o seguinte: mesmo em plantas da zona subtropical, de fôlhas caducas, a falta destes orgãos acarreta uma diminuição na concentração dessas substâncias, sem porém, no nosso caso, provocar o seu completo desaparecimento na haste. É que nas plantas desfólhadas, como o indicam por exemplo os resultados da tabela 3, nas experiências de 2/10 e 3/10 efetuadas com *Tecoma*, formam-se nesta época provavelmente novos centros de produção de auxinas, representados pela presença de flôres ou frutos. Mas além das fôlhas propriamente ditas, também o estado de brotação, isto é, a idade dos galhos a que estão apensas as fôlhas, tem grande importancia nesse teor de hormônios, como veremos a seguir.

c) Distribuição dos hormônios no câmbio de galhos de diferentes idades.

Para verificar se a idade do orgão influe sobremaneira na concentração de seu câmbio em hormônio, fizemos raspagens e determinações em câmbio de galhos velhos, comparativamente com galhos novos, e em câmbio de arvores completamente brotadas, assim como de arvores em início de brotação.

Resumimos os resultados dessas observações na tabela 4.

TABELA 4

Teor de hormônios do crescimento em cambio de galhos, novos e velhos, de *Tecoma ochracea, Populus nigra, Salix babylonica* e *Erythrina speciosa*

Datas	Plantas experimentais	Cambio de galhos velhos			Cambio de galhos novos		
		N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média	N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média
		Tratadas	Curvadas		Tratadas	Curvadas	
3/10/44	Tecoma	18	12	6,00° ± 1,41°	17	17	9,64° ± 1,07°
23/10/44	»	23	20	5,61° ± 0,83°	24	23	8,37° ± 1,03°
12/12/44	»	13	2	0,62° ± 0,41°	24	19	3,79° ± 0,62°
16/ 1 /45	»	20	0	0	20	20	13,20° ± 1,12°
8/11/44	Populus	7	2	3,85° ± 2,76°	7	7	14,14° ± 2,30°
14/11/44	»	19	5	1,52° ± 0,66°	18	18	13,61° ± 0,95°
14/11/45	»	13	0	0	...	...	... ...
22/11/45	»	...	...	... ...	20	20	14,60° ± 1,09°
30/ 1 /45	Salix	17	15	3,41° ± 0,52°	...	...	... ...
6/ 2 /45	»	...	...	... ...	24	24	15,00° ± 1,13°
19/ 7 /45	Erythrina	19	2	1,00° ± 0,84°	17	11	4,64° ± 1,24°
24/ 7 /45	»	18	8	2,33° ± 0,85°	17	15	4,82° ± 1,16°
25/ 9 /45	»	12	4	1,41° ± 0,83°	16	15	5,81° ± 0,99°

Os resultados da tabela 4 mostram que obtivemos valores mais elevados de curvatura a partir de cambio de galhos novos ou de arvores em início de brotação, do que de hastes velhas, desprovidas de fôlhas ou de arvores já completamente brotadas. Foi particularmente com *Populus*, e em seguida com *Tecoma* (figs. 12 e 13), que estas diferenças de concentração de hormônio entre câmbio de galhos de idade diversa se mostraram mais acentuadas. É interessante notar que estas duas espécies, uma nativa da zona temperada e outra da zona tropical, se comportaram, a este respeito, de maneira identica.

Passamos agora a reunir as observações sôbre a influência direta da floração no mencionado teor de hormônios das plantas.

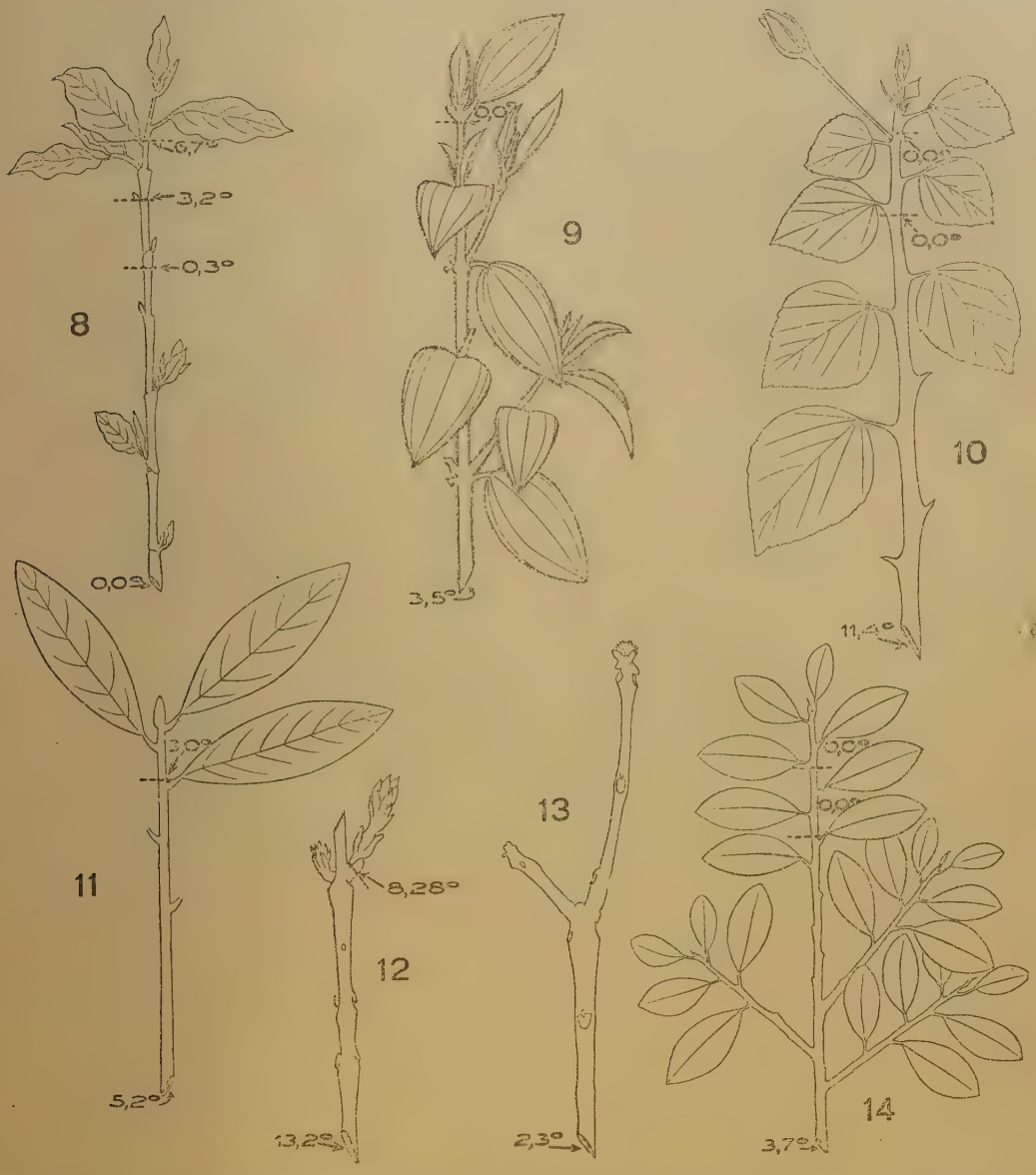


Fig. 8 — Distribuição de hormônios em broto novo (á direita — exp. de 31/10/44) e no cambio (á esquerda — exp. de 18/10/44) de hastes de 35 cm de comprimento, de *Magnolia liliflora*. (1/3 do tamanho natural). Fig. 9 — Distribuição de hormônios na parte apical de brotos (á direita) e no cambio (á esquerda), de haste de *Tibouchina urceolaris*. Exp. de 23/1/45. (¼ do tamanho natural). Fig. 10 — Distribuição de hormônios em brotos novos apicais (á direita) e no cambio (á esquerda), de haste de 35 cm de comprimento, de *Hibiscus rosa-sinensis*. Exp. de 9/1/45. (¼ do tamanho natural). Fig. 11 — Distribuição de hormônios em broto novo (á direita — exp. de 11/10/44) e no cambio (á esquerda — exp. de 5/3/45), de hastes de 35 cm de comprimento, de *Magnolia grandiflora*. (1/6 do tamanho natural). Fig. 12 — Teor de hormônios em apice de broto novo, de 4,5 cm de comprimento (á direita) e no cambio (á esquerda), de galhos em início de brotação, de *Tecoma ochracea*. Exp. de 16/1/45. (¼ do tamanho natural). Fig. 13 — Conteúdo de hormônios no cambio de galhos maduros, de 40 cm de comprimento, desprovidos de fôlhas, de *Tecoma ochracea*. Exp. de 24/7/45. (1/6 do tamanho natural). Fig. 14 — Conteúdo de hormônios em broto novo (á direita) e no cambio (á esquerda), de hastes de 40 cm de comprimento, de *Ficus retusa*. Exp. de 13/3/45. (1/6 do tamanho natural).

d) Distribuição dos hormônios de crescimento na época da floração e da frutificação.

Dispondo, em nosso ambiente, de plantas que florescem quando estão despidas da folhagem, condição que raramente foi pesquisada em outras partes, e tendo já estudado a influência de alguns fatôres internos (folhagem, idade dos galhos) na concentração de hormônios no cambio, o próximo passo de nossas pesquisas foi verificar e avaliar até que ponto podiam ser diferentes as determinações efetuadas em plantas apenas no estado vegetativo e aquelas em fase generativa.

Assim, com a técnica já descrita, de raspagens de cambio, determinamos o teor de hormônios do cambio de arvores na época da floração e da frutificação, comparando-o com as determinações feitas, nas mesmas espécies, em arvores em pleno periodo vegetativo.

A investigação foi dividida em duas partes. A primeira trata da determinação da auxina em plantas que não mostram rigorosa separação das fases vegetativa e reprodutiva, e a segunda, em plantas cuja floração precede consideravelmente o desenvolvimento das fôlhas.

Os resultados da primeira parte destes ensaios acham-se representados na tabela 5. Determinando o teor de hormônios de plantas deste grupo, utilisamo-nos das espécies *Ficus retusa, Tibouchina Sellowiana* e *Euphorbia pulcherrima*. Quando pesquisamos a auxina nestas espécies, em arvores sem flôres ou sem frutos, adotamos respectivamente, na tabela 5, os sinais (—) e (— —); e, em arvores com flôres ou com frutos, os sinais (+) e (++). No caso do *Ficus*, que produz verdadeiramente inflorescências ou infrutescências com o mesmo aspecto externo, a presença destes orgãos em cada série foi assinalada pelos dois primeiros sinais, ou pelos dois últimos, simultâneamente, por não oferecer interesse essa distinção neste caso. A média das curvaturas, das coleoptiles de aveia usadas, e o seu erro, foram calculados de maneira identica ao referido à tabela 2, pag. 114.

Como se verifica, dividimos a tabela 5 em duas partes, reservando a primeira delas às plantas em que não há efetivamente uma separação nitida entre as fases vegetativa e reprodutiva, e a segunda às plantas em que há normalmente uma separação, que consideramos aliás apenas parcial, entre as duas fases. Assim é que incluimos no primeiro grupo o gênero tropical *Tibouchina* ou quaresmeira, cujos ramos floriferos carregam também fôlhas, ao passo que o segundo grupo é constituido pela *Euphorbia* ou "Flôr de papagaio", que na época da floração comumente se apresenta despida de fôlhas verdadeiras, mostrando, entretanto, na ponta dos galhos, as fôlhas modificadas, ou bracteas.

TABELA 5

Difusão comparativa de hormônios do cambio de arvores que não mostram diferença nitida entre os periodos vegetativo e de florescimento

Datas	Plantas experimentais	Plantas sem flôres (—), s/ frutos (— —)			Plantas com flôres (+), c/ frutos (+ +)		
		N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média	N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média
		Tratadas	Curvadas		Tratadas	Curvadas	
23/ 1 /45	Ficus	22 ($\overline{\ \ }$)	13	2,09° ± 0,49°	....	...	.....
6/ 2 /45	»	.....	...	....	24 ($\overset{+}{+}$)	22	5,29° ± 0,63°
13/ 3 /45	»	14 ($\overline{\ \ }$)	13	3,78° ± 0,86°	....	...	.....
17/ 4 /45	»	22 ($\overline{\ \ }$)	12	3,31° ± 0,80°	....	...	.....
5/ 6 /45	»	.....	...	....	12 ($\overset{+}{+}$)	10	4,08° ± 0,68°
12/ 7 /45	»	24 ($\overline{\ \ }$)	5	0,58° ± 0,26°	....	...	.....
16/ 8 /45	»	.....	...	....	20 ($\overset{+}{+}$)	18	12,70° ± 1,49°
4/ 9 /45	»	13 ($\overline{\ \ }$)	7	1,92° ± 0,65°	....	...	.....
5/ 9 /45	»	21 ($\overline{\ \ }$)	21	8,66° ± 0,82°	....	...	.....
17/10/45	»	.....	...	....	11 ($\overset{+}{+}$)	8	4,09° ± 1,05°
27/ 2 /45	Tibouchina	23 (—)	23	16,34° ± 1,24°	....	...	.....
13/ 3 /45	»	12 (—)	11	10,83° ± 2,06°	....	...	.....
17/ 4 /45	»	10 (—)	10	13,10° ± 2,10°	....	...	.....
2/ 8 /45	»	8 (—)	1	0,5° ± 0,5°	11 (+)	3	1,72° ± 1,11°
9/ 8 /45	»	12 (—)	9	3,0° ± 0,77°	12 (+)	12	12,08° ± 1,49°
17/10/45	»	.....	...	....	12 ($\overset{+}{+}$)	4	2,58° ± 1,28°
9/ 1 /45	Euphorbia	7 (—)	7	12,71° ± 1,34°	....	...	.....
26/ 2 /45	»	36 (—)	36	11,83° ± 1,06°	....	...	.....
20/ 3 /45	»	13 (—)	12	10,07° ± 1,88°	....	...	.....
2/ 5 /45	»	.....	...	....	24 (+)	24	10,58° ± 0,78°
8/ 8 /45	»	22 (—)	5	0,95° ± 0,43°	22 (+)	4	1,00° ± 0,69°
25/ 9 /45	»	18 (—)	8	2,05° ± 0,71°	17 (+)	11	2,29° ± 0,66°

Referindo-nos às plantas do primeiro grupo, isto é, às plantas que como o *Ficus* e *Tibouchina*, mesmo durante a floração têm fôlhas, verifica-se geralmente um acrescimo do teor de hormônios nos ramos que têm flôres. Deve-se frizar, por outro lado, porém, que em plantas deste grupo o efeito da floração não se manifesta de maneira acentuada, uma vez que os botões de fôlhas e as próprias fôlhas novas agem, provavelmente, como fontes de hormônio.

Em todo caso, porém, em *Ficus* verificamos, em 9 das 10 séries referidas na tabela 5, um teor um pouco maior de hormônios em exemplares munidos de inflorescências. A diferença entre plantas sem e com inflorescências torna-se especialmente notavel nos meses do verão (exps. de 23/1, 6/2 e 13/3, fig. 14), porque logo antes da primavera, com o surto das novas fôlhas esse teor, mesmo nas plantas que não têm inflorescências, é elevado (exp. de 5/9/45).

Como no caso do *Ficus*, nas observações realizadas com a *Tibouchina* verificamos também uma influência tanto das fôlhas como das flôres. Nos meses de Fevereiro, Março e Abril, quando estudamos arvores desta espécie no estado de nova brotação e munidas apenas de fôlhas, encontramos um teor elevado de hormônios (fig. 15). Nos meses do inverno, porém, a presença de fôlhas velhas já não estava relacionada com uma quantidade elevada dessas substâncias. Nestes meses, portanto, como indica a exp. de 9/8/45, as plantas que tinham flôres superaram nitidamente as de comparação (fig. 16).

A influência da floração em *Euphorbia* expressa-se de maneira muito semelhante ao caso da *Tibouchina*. Observamos, também aqui, que no fim do inverno e começo da primavera o teor de hormônios, que era elevado nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março, baixou consideravelmente. Nestes meses de baixo teor de hormônios (exps. de 8/8 e 25/9/45), mostrou-se, então, uma ligeira superioridade das plantas dotadas de flôres sôbre as arvores apenas com fôlhas.

E com isto vamos passar á segunda parte de nossas pesquisas sôbre a influência da floração. Tratando do agrupamento das plantas cuja floração precede consideravelmente o desenvolvimento das fôlhas, ai reunimos duas arvores tipicas, usadas largamente para a ornamentação de parques e jardins e cujos gêneros pelo menos são bastante representados na flora brasileira. Tais plantas são o *Tecoma ochracea* ou Ipê amarelo e a *Erythrina speciosa* ou "canivete".

Os resultados do estudo destas duas espécies, em que a fase generativa normalmente é caracterizada pela ausencia da folhagem, encontram-se na tabela 6. De modo geral valem, para a compreensão

Fig. 15 — Conteúdo de hormônios em apice de broto novo (á direita) e no cambio (á esquerda), de hastes de 35 cm de comprimento, de *Tibouchina Sellowiana*, sem flôres. Exp. de 13/3/45. (¼ do tamanho natural). Fig. 16 — Conteúdo de hormônios do cambio de uma haste de 30 cm de comprimento, de *Tibouchina Sellowiana*, com flôres e botões. Exp. de 9/8/45. (¼ do tamanho natural). Fig. 17 — Conteúdo de hormônios de cambio de uma haste de 40 cm de comprimento, de *Erythrina speciosa*, sem fôlhas mas com inflorescências. Exp. de 24/7/45. (⅛ do tamanho natural). Fig. 18 — Conteúdo de hormônios do cambio de uma haste de 40 cm de comprimento, de *Erythrina speciosa*, enfolhada. Exp. de 24/7/45. (⅛ do tamanho natural). Fig. 19 — Haste típica, de 35 cm de comprimento, de *Tecoma ochracea*, florida e sem nenhuma fôlha, indicando o teor de hormônios do crescimento determinado no cambio. Exp. de 22/8/45. (⅙ do tamanho natural).

desta tabela, as mesmas explicações fornecidas para a tabela 5, à pag. 120. Aqui, porém, introduzimos uma pequena modificação, na coluna das "plantas experimentais", na qual para cada ensaio detalhamos desta vez o carater vegetativo da planta, a-fim-de poder compara-lo mais facilmente com a influência exclusiva da floração no teor em hormônios das hastes. Nesta coluna encontramos pois referências à mesma espécie de planta denotando ausencia de folhagem (s/fôlhas), completamente brotada (c/fôlhas) ou no seu periodo intermediario do início de uma fase de crescimento (c/brotação).

Os resultados gerais e simplificados, da tabela 6, mostram duas possibilidades: que, na *Erythrina,* os orgãos da reprodução desempenham mais um papel de centro de consumo, ao passo que em *Tecoma* eles agem como pequenos centros de produção de hormônios.

Nos ensaios realizados com *Erythrina* pudemos verificar que a fase da floração é geralmente caracterisada por um teor relativamente baixo de hormônios do crescimento (fig. 17). Nesta espécie a presença de fôlhas contribue muito mais à elevação desse teor do que a existência das inflorescências (fig. 18). Podemos tirar essa conclusão da comparação dos dados que obtivemos no ensaio realizado em 25/9/45. Na primeira parte deste ensaio estudamos o cambio de uma planta em nova brotação e desprovida de flôres, obtendo nas coleoptiles de aveia curvaturas 4 vezes maiores do que na segunda parte, onde estudamos uma planta com frutos mas sem fôlhas.

As demais séries de ensáios, efetuados com *Erythrina,* confirmam nossa opinião sôbre a relativamente pequena influência que a presença de flôres exerce na referida concentração de hormônios nesta espécie. É verdade que todas essas demais séries foram efetuadas com *Erythrina* no estado de floração: nos casos em que estas plantas, floridas, já tinham começado a produzir fôlhas, obtivemos curvaturas muito mais acentuadas das coleptiles de aveia do que nos casos em que pesquisamos com plantas ainda sem fôlhas. Parece, assim, que o desenvolvimento da inflorescência na *Erythrina* está relacionado com um consumo interno de hormônios e que as fôlhas novas agem como fontes principais destas substancias.

Deparamos, porém, condições bem mais complexas nos resultados dos ensáios realizados com *Tecoma.* Quando o *Tecoma* está apenas com fôlhas velhas e sem as flôres, isto é, nos meses de Novembro-Agosto, verificamos um teor muito baixo de hormônios do crescimento no cambio desta planta. Em fins de Agosto, porém, quando essas arvores começam a se cobrir de flôres, ao passo que os botões foliares se encontram ainda fechados, notamos acentuado aumento

TABELA 6

Difusão comparativa de hormônios do cambio de arvores que mostram diferença nitida entre os periodos vegetativo e de florescimento

Datas	Plantas experimentais	Plantas sem flôres (—), s/ frutos (——)			Plantas com flôres (+), c/ frutos (+ +)		
		N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média	N.º de aveias		Média das curvaturas e erro da média
		Tratadas	Curvadas		Tratadas	Curvadas	
19/ 7 /45	*Erythrina* (c/ fôlhas)	...	..	.....	17 (+)	11	4,64º ± 1,24º
19/ 7 /45	» (s/ fôlhas)	...	..	.....	19 (+)	2	1,00º ± 0,84º
24/ 7 /45	» (c/ fôlhas)	...	..	.....	17 (+)	15	4,82º ± 1,16º
24/ 7 /45	» (s/ fôlhas)	...	..	.....	18 (+)	8	2,33º ± 0,85º
25/ 9 /45	» (c/ fôlhas)	16 (—)	15	5,81º ± 0,99º	....	...	....
25/ 9 /45	» (s/ fôlhas)	...	..	.....	12 (+ +)	4	1,41º ± 0,83º
2/10/44	*Tecoma* (s/ fôlhas)	...	..	.....	33 (+)	25	3,51º ± 0,55º
3/10/44	» (s/ fôlhas)	...	..	.....	18 (+)	12	6,00º ± 1,41º
3/10/44	» (c/ brotação)	17 (—)	17	9,64º ± 1,07º	....	...	... ...
23/10/44	» (c/ fôlhas)	...	..	.....	23 (+ +)	20	5,61º ± 0,83º
23/10/44	» (c/ brotação)	...	..	.....	24 (+ +)	23	8,37º ± 1,03º
16/ 5 /45	» (c/ fôlhas)	22 (—)	5	1,95º ± 0,92º	....	...	....
5/ 6 /45	» (c/ fôlhas)	12 (—)	0	0	....	...	....
24/ 7 /45	» (c/ fôlhas)	19 (—)	5	2,31º ± 1,07º	....	...	....
9/ 8 /45	» (c/ fôlhas)	...	..	.....	17 (+)	9	3,23º ± 0,96º
10/ 8 /45	» (s/ fôlhas)	11 (—)	2	0,81º ± 0,55º	....	...	....
10/ 8 /45	» (c/ fôlhas)	16 (—)	4	0,93º ± 0,52º	....	...	....
22/ 8 /45	» (s/ fôlhas)	...	..	.....	18 (+)	14	4,44º ± 1,44º
4/ 9 /45	» (s/ fôlhas)	...	..	.....	15 (+ +)	15	10,73º ± 0,82º
5/ 9 /45	» (s/ fôlhas)	...	..	.....	16 (+)	13	4,43º ± 1,07º

dessas substancias. Queremos citar, como exemplo, os resultados que obtivemos em 10/8 e 22/8/45: na primeira destas datas, pesquisando o cambio de uma planta sem flôres, mas ainda provida de fôlhas velhas, verificamos apenas curvaturas cuja média alcançou 0,93°; poucos dias mais tarde, em 22/8, investigando uma planta que não tinha mais fôlhas, mas que se achava já na época da floração, obtivemos curvaturas cuja média foi 4 vezes maior (fig. 19). Estudando ainda, em 4/9/45, uma planta sem fôlhas que estava provida de flôres e frutos, mas ainda não apresentava fôlhas novas, encontramos um teor excepcionalmente elevado de hormônios.

Para explicar esses resultados deve-se admitir, portanto, que no caso do *Tecoma* o início da floração coincide de fato com o aumento do teor de hormônios, que são produzidos possivelmente pelas proprias flôres. Não se exclue a possibilidade, porém, de que mais tarde também os frutos contribuam para manter esse teor em nivel elevado.

Procuramos destacar aqui a importancia dos orgãos de propagação nas flutuações anuais do teor de hormônios. Todavia devemos mencionar que no *Tecoma*, como aliás aconteceu também em outras espécies de arvores que estudamos, o aparecimento das fôlhas novas correspondeu quase sempre a periodos em que deparamos com grandes concentrações dessas substâncias do crescimento. Talvez seja interessante chamar ainda a atenção para a experiência de 5/6/45, feita com a mesma espécie de *Tecoma*, em que não se notou essa influência, geralmente tão marcada, da nova brotação, no aumento do teor dessas substâncias. Tratava-se porém aqui de uma planta que no outono, isto é, fóra do tempo, emitira novos brotos, que chamamos de 2.ª brotação atrazada; entretanto, o cambio das hastes desta planta não revelou, mesmo assim, a presença de hormônios. O aparecimento das flôres, que ocorreu cerca de 2 meses mais tarde, é que produziu uma nitida elevação no teor destas substâncias.

Após termos estudado a influência de alguns fatôres internos no teor de hormônios do cambio, podemos agora passar a considerar a influência dos fatôres externos na referida concentração destas substâncias: referimo-nos á apresentação, com maiores detalhes, das observações feitas com relação á distribuição anual dos hormônios de crescimento e á sua interpretação, de conformidade com as caracteristicas das plantas estudadas.

e) Variações anuais da concentração de hormônios do crescimento.

Na tabela 2, em que reunimos todos os resultados referentes ao estudo efetuado com o cambio, quizemos dar apenas uma idéia geral

do conteúdo provavel de hormônios, de diversas espécies de plantas da zona subtropical. Na verdade esse conteúdo é sujeito a grandes flutuações, como o estudo da influência da folhagem, da idade das hastes e da floração, já nos indicaram.

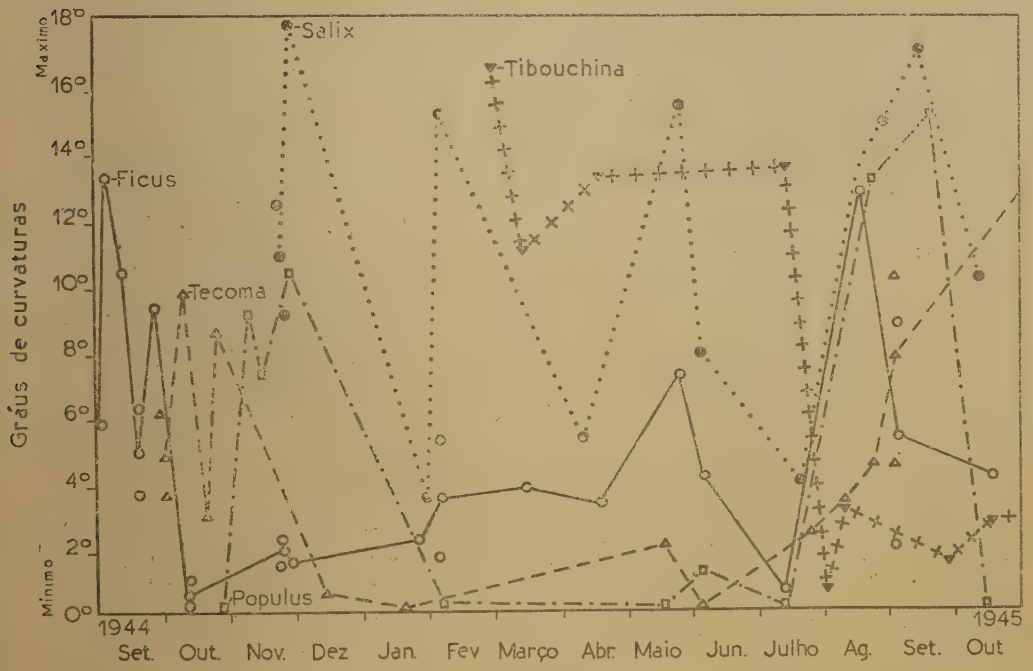


Fig. 20 — Curvas de determinação de hormônios do crescimento, no cambio de galhos de *Ficus retusa, Tecoma ochracea, Populus nigra, Salix babylonica* e *Tibouchina Sellowiana*, expressas em gráus de curvatura de coleoptiles de aveia. Convem notar que em alguns casos, em que dispunhamos de dados obtidos em datas muito proximas (diferença de 1 dia), fizemos o traçado das curvas passar pelo ponto que representa a média dessas duas determinações.

Surge assim a questão de saber qual é a amplitude dessas flutuações, que passam despercebidas na referida tabela, e como estão elas relacionadas com o desenvolvimento anual das plantas. Este estudo, feito comparativamente entre 5 diferentes gêneros e espécies de plantas, em diversas épocas do ano, foi realizado com hastes de cerca de 40 centimetros de comprimento, de *Ficus retusa, Tecoma ochracea, Salix babylonica, Populus nigra* e *Tibouchina Sellowiana*, nas quais executamos raspagens de cambio, da primavera de 1944 á de 1945, efetuando então as determinações de acordo com as estações do ano e com o estado vegetativo das plantas. Os resultados destas investigações acham-se representados na fig. 20.

Desta figura resultam, a nosso vêr, as seguintes conclusões:

1. — Quase todas as plantas, nas nossas condições, mostraram atingir a ponto máximo do conteúdo de hormônios no cambio nos meses frios e secos correspondentes ao fim do inverno e princípios da primavera, isto é, de Agosto a Outubro. Observamos, então, que esse máximo é geralmente alcançado ainda antes do início das chuvas. Fez exceção particularmente a *Tibouchina,* que de acordo com os dados do gráfico mostrou, na mesma época, um declinio gradual, tendendo para um baixo teor de hormônios.

2. — Em plena primavera, que entre nós é representada por tempo não muito quente e como início da estação das chuvas, o teor de hormônios das plantas foi irregular, ás vezes baixo (*Ficus, Tibouchina*), ou quando começou elevado, tendeu a baixar (*Salix, Populus*).

3. — O verão, que em São Paulo é quente e muito úmido, coincidiu, na maioria das vezes, com valores baixos das concentrações de hormônio (*Populus, Tecoma, Ficus*), exceção feita agora do *Salix* e da *Tibouchina,* cujas concentrações baixaram aliás muito, ainda na mesma estação.

4. — No outono, que corresponde aos meses de Março-Junho, periodo em que se inicia o frio e normalmente terminam as chuvas, notamos baixos niveis de difusão de auxina (*Tecoma, Populus*) ou tendencia, com pequenas flutuações, para um baixo nivel (*Ficus, Salix*).

5. — A curva de *Ficus,* de um carater relativamente regular, mostrou atingir o máximo em Agosto-Setembro, apresentando mínimos logo antes e depois desse máximo, isto é, em Julho e Outubro. Encontramos, além disso, duas pequenas flutuações, uma ainda na primavera, em 25 de Setembro de 1944, e outra correspondente ao outono, em 24 de Maio de 1945, quando esta espécie apresentou um aumento passageiro do teor de hormônios.

Acompanhando agora o ciclo vegetativo do *Ficus,* verificamos que nos meses de Outubro a Janeiro, em que é baixo o seu nivel de hormônios, estas plantas têm geralmente os seus galhos já formados, de coloração marron-esverdeada e que nos poucos galhos em que existe brotação, esta é terminal e não dá impressão de crescimento ativo. Pelo contrário, em seguida aos meses de Fevereiro a Abril, e também após Julho, em que observamos grande número de novas brotações, as determinações acusaram teor mais elevado até atingir o máximo em Agosto. Portanto, cremos que nesta espécie o crescimento está associado a um aumento da concentração de hormônios, ao passo que a falta de crescimento está relacionada com baixo teor de hormônio.

6. — Nas duas plantas da familia das Salicáceas, o salgueiro (*Salix*) e o choupo (*Populus*), o comportamento foi, até certo ponto, diverso.

Na curva do *Populus* expressa-se bem a diferença entre as estações do ano. Ela atinge praticamente o mínimo durante os primeiros 6 meses do ano, isto é, de Fevereiro a Julho: depois, nos seguintes 3 meses, sobe rapidamente, alcançando o ponto maximo justamente em Setembro. Se nos basearmos nas observações feitas ao término de 1944, podemos dizer ainda que após um novo mínimo, atingido em Outubro, possivelmente esta espécie alcança novo máximo cerca de Dezembro.

As observações fenológicas desta espécie mostram que em Fevereiro ainda existem galhos verdes, mas daí em diante é mais comum encontrarem-se hastes acinzentadas, de galhos mais idosos, desprovidos de nova brotação. Em Julho os galhos maduros apresentam as fôlhas requeimadas pelo frio, mas na ponta deles já se mostram brotações novas. Brotações também se observam, em grande número, em Agosto e Setembro, isto é, antes da primavera, justamente quando é mais elevado o teor de hormônios desta planta. Portanto, também aqui, em analogia com o *Ficus*, o crescimento está relacionado com um aumento do teor de hormônios, ao passo que no periodo de repouso fisiológico desta espécie as determinações não acusam, ou demonstram muito pequenas concentrações dessas substancias.

Vejamos agora o comportamento do *Salix*. A curva hormonal desta planta é bem diferente das demais: ela tem 4 pontas, correspondendo cada máximo a um ciclo aproximadamente de 3 meses. Desta maneira, nesta espécie as maiores concentrações de hormônios, expressas em gráos de curvatura de coleoptiles de aveia, foram verificadas, respetivamente, em Novembro, Fevereiro, Maio e Setembro, épocas que coincidem com o fim da primavera, meio do verão, fim do outono e novamente começo da primavera.

Confrontando ainda estes dados com o carater fenológico desta planta, pode-se verificar que os surtos de crescimento desta espécie ainda se relacionam, de uma maneira ou outra, com a presença de quantidades fisiológicamente elevadas de hormônios de crescimento.

7. — O *Tecoma* apresenta também uma curva irregular, com suas pontas localisadas de modo característico nos últimos meses do ano, isto é, em Setembro-Outubro; os demais meses do ano, especialmente de Dezembro a Junho, são representados por quédas bruscas do nivel de hormônios, que chegam até zero, respetivamente em Janeiro e Junho.

Pois bem, as elevadas concentrações de hormônio nesta espécie se relacionam: em principios de Setembro, com a época do florescimento e provavelmente ainda com o grande armazenamento nos botões foliares, prestes a iniciarem a brotação primaveril; e, no fim deste mês, e em Outubro, com o início da brotação propriamente dita. No começo da epoca do florescimento, isto é, em Agosto, a concentração de hormônios mostrou-se ainda baixa, mas nesta epoca as plantas somente têm fôlhas velhas e ressequidas, ou estão-se despindo completamente da folhagem. Em arvores que estão produzindo a primeira brotação atrazada, em meiados de Janeiro, determinamos elevado teor de hormônios, mas no nosso gráfico não levamos em consideração estes dados por serem excepcionais; já em arvores que estão produzindo a segunda brotação regular, em meiados de Janeiro, ou a segunda brotação atrazada, em Junho, não pudemos verificar a presença dos fitohormônios, ao passo que em arvores na fase da terceira brotação regular, em meiados de Maio, verificamos um aumento passageiro do teor nestas substancias, que aliás foi baixo.

8. — Consideremos finalmente a situação da *Tibouchina*. Faltam-nos dados de alguns meses para completar o ciclo anual. Mesmo assim, os resultados que obtivemos já nos dão indicações de um comportamento interessante desta planta, bem diverso do das quatro outras com que foi ela comparada.

Efetivamente, nos primeiros 6 meses do ano, isto é, de Fevereiro a Julho, as determinações acusaram teor elevado de hormônios, ao passo que nos seguintes e restantes 4 meses, de que possuimos dados, esse teor foi baixo. Embora se trate de uma planta herbácea, típica da flóra brasileira, e que está sempre revestida de folhagem, associamos as maiores concentrações de hormônios nas plantas desta espécie com as fases de nova brotação, de preparação para o florescimento e da propria floração; ao contrário, os valores baixos parece que se relacionam com a ausencia de nova brotação, pelo menos ativa, e com a fase de frutificação.

DISCUSSÃO

Expusemos, na parte deste trabalho referente à apresentação dos resultados, os dados obtidos numa série de experiências que levamos a efeito sôbre a determinação de hormônios em plantas da flôra brasileira. Antes, porém, de tentar confrontar os nossos resultados com as referências da literatura, avaliemos a exatidão dos métodos que empregamos.

Para esse fim podemos separar o processo que seguimos em duas etapas: a difusão natural dos hormônios para o agar e a dosagem dessas substancias pela determinação do gráo de curvatura que elas acarretam nas coleoptiles de aveia.

A respeito do processo de difusão, devemos distinguir as experiências em que nos utilisamos de orgãos inteiros, das em que empregamos raspagem de cambio.

Com a difusão natural, a partir de orgãos inteiros de plantas, visamos a verificação do teor de hormônios já formados (não existentes em fórma de p r e c u r s o r e s) e que espontaneamente se difundem. Os resultados que obtivemos, que não corresponderam á nossa expetativa devido a defeitos do material e a variações que escaparam ao nosso controle, podem contudo ser comparados com as numerosas indicações de outros autores que usaram o mesmo processo. Fazemos menção aqui dos trabalhos de DOLK e THIMANN (8, 1932), de THIMANN e SKOOG (28, 1934), de ZIMMERMANN (34, 1936), de AVERY, BURKHOLDER e CREIGHTON (1, 1937 a; 2, 1937 b), de GOODWIN (10, 1937), de SÖDING (26, 1937; 27, 1938) e de BENNETT e SKOOG (5, 1938).

Quanto á significação do processo de difusão a partir de raspagem de cambio, método idealisado por SÖDING (26, 1937) e largamente usado no nosso trabalho, é claro que por ele não se consegue avaliar a difusão espotânea, que se obtem pelo orgão intáto. Já SÖDING frizou que esta técnica corresponde mais á uma extração aquosa do material do que propriamente a uma difusão natural. Por outro lado, porém, este processo oferece certas vantagens (simplicidade e uniformidade), especialmente em ensáios com espécies que se caracterizam por um baixo teor de hormônios, cuja avaliação pelo outro processo seria dificil. Desta maneira, os resultados que obtivemos nas experiências executadas com raspagem de cambio podem ser comparados, estritamente, apenas com os mencionados em trabalhos que se baseiam na aplicação do mesmo processo de difusão (SÖDING, 26, 1937). Em qualquer caso, porém, este processo fornece indicações que convêm sejam levadas em consideração, ao comparar os resultados a que chegamos com os dados referidos por outros autores.

Para a dosagem dos hormônios fizemos uso do método classico de WENT, de determinação de curvaturas de coleoptiles de aveia, na modificação descrita por SÖDING (24, 1935). Esta modificação permite a execução do teste em condições normais de iluminação, de temperatura e de umidade do laboratorio. É obvio que os resultados conseguidos com esta adaptação simples não alcançam a exatidão de

determinações executadas em laboratorios que dispõem de instalações especiais para garantir a constancia dos fatôres externos, durante a experimentação. Todavia obtivemos com esta técnica valores quantitativos e comparaveis entre si, ao passo que, pela sua aplicação, evitamos a ocorrência de irregularidades do crescimento das coleoptiles, atribuidas em outros laboratorios á insuficiência da ventilação.

Tentaremos, após esta ligeira avaliação dos nossos métodos, comparar as referências da literatura com alguns dos resultados das nossas experiências. Não achamos necessario, nesta discussão dos resultados, insistir em questões já esclarecidas por outros autores, como por exemplo a influência da folhagem e da idade dos galhos na produção de hormônios; preferimos, por isso, expor apenas alguns detalhes, até agora menos exhaustivamente tratados na literatura. Dentre esses detalhes referir-nos-emos ás espécies de plantas estudadas, ás flutuações anuais no seu teor de hormônios, e á influencia da floração.

Referindo-nos ás espécies de plantas estudadas, cumpre mencionar em primeiro lugar o *Tecoma ochracea*, a *Tibouchina Sellowiana* e a *Chorisia speciosa*, que pertencem a familias tipicamente tropicais, como a das Bignoniáceas, Melastomáceas e Bombaçáceas, respetivamente. Outra espécie, com a qual efetuamos também alguns ensaios, foi a *Erythrina speciosa*, cujo genero aliás é bastante representado igualmente na flora brasileira, mas que pertence a uma familia de distribuição universal (Papilionáceas). Há ainda outro grupo a mencionar, de plantas aclimadas e cultivadas em nossos jardins, como o *Ficus retusa*, de origem asiatica e a *Euphorbia pulcherrima*, proveniente da America Central, que incluimos ainda nos nossos ensaios.

Para fins de comparação procuramos referências ás citadas espécies na literatura ao nosso alcance, como sejam nos resumos de Boysen Jensen (6, 1936, p. 59-63), Haagen-Smit (14, 1939, p. 353-355), assim como nos trabalhos originais, concernentes, de Zimmermann (34, 1936), Söding (26, 1937; e 27, 1938), Avery, Burkholder e Creighton (1 e 2, 1937 a e b), Lefèvre (18,1939), Wittver (33, 1943) e van Overbeek (31, 1943-1944) sem encontrar, todavia, nenhuma menção quanto ao teor natural de hormônios do crescimento nestas plantas. Por isso consideramos que, se pudemos de fato colher alguns novos dados, ainda não referidos por outros autores, devemo-lo principalmente ao fato de termos trabalhado com representantes de floras ainda pouco exploradas em estudos relativos ao metabolismo hormonal.

Entretanto, ao lado das plantas características de regiões tropicais e subtropicais acima citadas, dispuzemos em São Paulo de espécies europeas e norte-americanas, pertencentes aos generos *Salix* e *Populus*, cujo teor de hormônios, com suas flutuações anuais e demais problemas afins, já foram parcialmente estudados, em zona temperada, por MAC-DOUGAL (19, 1936) e SÖDING (26, 1937). Estes dois generos, utilisados também em nossos ensaios, são os que nos permitem estabelecer certas relações entre o comportamento das plantas, quando estudadas no seu habitat natural e em São Paulo.

Para tanto, vamos nos referir inicialmente a literatura que trata das pesquisas feitas com essas plantas na zona temperada. Dos dados apresentados por SÖDING no seu estudo com o *Populus tremula* nas condições da Europa Central, depreende-se que esta planta atinge a maior concentração de hormônios em Junho, isto é, na primavera europea. Para a mesma espécie de planta, o mínimo foi verificado nos meses de Dezembro até Abril, isto é, na época do inverno, quando não se pôde demonstrar a presença de hormônios do crescimento nessa planta. Infelizmente SÖDING não extendeu também seus estudos a plantas do genero *Salix*, de modo que escasseiam até certo ponto as informações disponiveis quanto ao comportamento deste genero na propria zona temperada.

Dispomos entretanto de resultados de pesquisas, realisadas igualmente em zona temperada, com plantas deste genero, e que embora de outra natureza indiretamente podem-nos esclarecer sôbre o assunto. Das observações de MAC-DOUGAL, por exemplo, relativas á *Salix lasiolepis* e obtidas em Washington com o método dendrográfico, podemos depreender que alí o crescimento radial do tronco de *Salix* começou em 6 de Maio, atingiu o maximo em principios de Junho e cessou logo em Julho. De acordo com MAC-DOUGAL (19, p. 158) o crescimento de *Salix* em espessura se efetua dentro do prazo de 100 dias. O mesmo autor também acentúa a grande semelhança, no ciclo do crescimento, entre *Salix* e *Populus*: ambas, nas condições de Washington, completam o crescimento anual em espessura dentro de um periodo relativamente curto do ano.

Como o crescimento em espessura parece estar diretamente ligado á concentração de hormônios na planta, é provavel que as variações desse teor no *Salix* correspondam ás do *Populus*. Aliás esse comportamento, com relação ás flutuações a que o teor de hormônios está sujeito durante as diversas estações do ano, parece ser geral entre as espécies que crescem na zona temperada, como se pode depreender dos trabalhos de AVERY e colaboradores (1, 1937 a) e

SÖDING (26, 1937), efetuados com *Malus Malus, Aesculus Hippocastanum* e *Acer Trautvetteri.*

Esses trabalhos de algum modo completam, pois, as indicações de que necessitamos a-fim-de estabelecer as eventuais diferenças que se verificam entre as plantas nas condições temperadas e subtropicais.

Resumindo nossas considerações acerca da literatura pertinente ás plantas da zona temperada, estudadas no seu proprio habitat, podemos dizer que nas arvores da referida zona climatica não foi demonstrada, no inverno, a presença de hormônios do crescimento ativos, e que o maximo de concentração dos hormônios foi atingido no periodo da nova brotação, que coincide justamente com a primavera.

Vejamos agora como se comportaram, nas nossas condições, as especies que nos servem de comparação e que são provenientes da zona temperada.

Consideramos especialmente característica a curva correspondente a *Populus nigra* (fig. 20). Esta curva, que começa em nivel elevado em Novembro de 1944, cai abruptamente em Fevereiro de 1945, até o nivel zéro, que é praticamente conservado daí em diante até o mez de Julho. Este nivel baixo é seguido, todavia, por uma ascenção brusca em Agosto, atinge de novo o maximo em Setembro, mantendo-o até Novembro. Esse tipo de flutuações no teor de hormônios do crescimento do *Populus nigra* mostra, de um lado, que a espécie já se aclimou parcialmente ás nossas condições. Dizemos parcialmente porque, de conformidade com os mencionados resultados obtidos por SÖDING com *Populus tremula,* esta planta atinge a maior concentração de hormônios em Junho, isto é, na primavera europea, ao passo que em São Paulo esse maximo, pelo menos em *Populus nigra,* coincidiu com a nossa primavera, manifestando-se portanto em Setembro. Por outro lado, porém, a falta de difusão de hormônios, que notamos nessa planta durante o fim do nosso verão, o outono e o começo do inverno, parece-nos dever relacionar-se com a sua proveniência de outra zona climática. Como se trata de planta da zona temperada, cuja atividade meristemática é completamente paralizada durante o inverno no seu habitat natural (SÖDING, 26, p. 656), achamos possivel que também nas nossas condições climáticas esta planta conserve o ciclo vegetativo marcado por uma interrupção completa da atividade dos hormônios durante varios meses.

Bem diferente, todavia, se mostrou o comportamento do *Salix babylonica,* a segunda especie por nós pesquisada como exemplo da vegetação arborea da zona temperada. O teor de hormônios do crescimento desta planta apresentou — nas condições climáticas de São

Paulo — flutuações muito fortes durante o ano todo (fig. 20), visto que os pontos de culminação, atingidos em Dezembro, Fevereiro, Maio e Setembro, foram logo seguidos de quedas fortes, que ocorreram respetivamente ao começo de Fevereiro, no meio de Março e no fim de Julho. Acreditamos, assim, que esta planta se adatou ás condições climáticas do novo ambiente de uma maneira diferente da do *Populus*. Enquanto este ultimo genero conservou, mesmo no nosso clima de região subtropical, um periodo de baixo teor de hormônios, cuja ocorrencia na região temperada é bem compreensivel pelo rigor da estação de inverno e durante o qual o crescimento está forçosamente paralizado, no caso do *Salix* foi diferente: o cambio continuou apresentando elevada quantidade de hormônios, mesmo nos meses do inverno. Parece, pois, que no nosso ambiente o *Salix* reage quase unicamente ás condições climáticas externas do momento, ao passo que a reação do *Populus* é a resultante não só dessas condições, mas ainda de uma periodicidade interna.

Discutiremos neste ponto os resultados de nossos ensaios feitos com algumas plantas indigenas ou aclimadas e que, a nosso vêr, não tinham ainda constituido objeto de estudos a outros autores.

Se considerarmos como representante de nossa flora o *Tecoma ochracea* ou Ipê amarelo, verificamos que esta especie atinge altos valores de concentração de hormônios na primavera (Outubro de 1944; Agosto, Setembro, Outubro de 1945), ao passo que nos meses do verão, outono e inverno (Dezembro de 1944 até Junho de 1945) se mantem num nivel baixo. A curva hormonal desta planta caracteriza-se portanto por um maximo bem acentuado, sem apresentar outras oscilações de amplitude muito elevada (fig. 20). Talvez este carater "equilibrado" da curva se relacione com o fato de ser o *Tecoma* originario daqui e não adatado a um novo ambiente climático.

Correspondente á curva do *Tecoma* é também, até certo ponto, a que é ilustrativa do *Ficus retusa* (fig. 20). É verdade que esta especie não é nativa do Brasil e sim proveniente das Indias, isto é, de uma zona climática provavelmente muito analoga á nossa. A curva desta especie apresenta igualmente um carater "equilibrado", com pontos de culminação no fim do inverno, isto é, no começo de Setembro de 1944 ou no fim de Agosto de 1945. Comparando, porém, a curva de *Ficus* com a de *Tecoma*, notamos que a primeira se mantem, mesmo nos meses do inverno, num nivel relativamente elevado, sem nunca atingir o eixo das abcissas. Neste particular, pois a curva de *Ficus* distingue-se fundamentalmente das que SÖDING (26, 1937) e AVERY e colaboradores (1, 1937 a) obtiveram, estudando

Aesculus, Acer, Populus e *Malus,* verificando que, nestas arvores, na epoca do inverno, não se pode demonstrar a ocorrencia de hormônios do crescimento.

Se, no caso por nós estudado, do *Ficus,* a relativa constancia de um nivel elevado de hormônios durante o ano todo se deve mais á origem tropical da planta ou ás condições climáticas clementes do habitat de São Paulo, é dificil decidir com segurança. Entretanto, como o *Tecoma* se comportou, até certo ponto, de maneira diferente, acreditamos que a periodicidade interna de cada especie é em parte responsavel por esses caracteres das curvas exhibidas.

Resta-nos ainda comentar a curva obtida com o material de *Tibouchina Sellowiana* ou quaresmeira e que se distingue, nitidamente, das a que nos referimos até agora. Com efeito, nesta especie, cujos estudos aliás iniciamos apenas em Fevereiro de 1945, encontramos o mais elevado teor de hormônios do crescimento logo no referido mês daquele ano (fig. 20). A curva se manteve depois num nivel alto até o mês de Julho, para decrescer em Agosto, isto é, justamente na mesma epoca em que as outras plantas apresentam um notavel aumento no teor destas substâncias. Ao contrario do *Tecoma* e da maioria de outras arvores da vegetação brasileira que florescem na primavera, isto é, entre Setembro e Novembro, as Quaresmeiras florescem geralmente cerca de 6 meses antes, na epoca da quaresma ou Pascoa, entre Março e Maio. Não podemos portanto extranhar que, nesta especie, como nas demais, o inicio da floração, que provavelmente também significa um inicio da formação de novos botões foliares, coincida com o maximo do teor de hormônios do crescimento.

Neste ponto voltamos ao nosso problema basico, referente á existencia de uma eventual diferença fundamental nas flutuações anuais do teor de hormônios, entre as arvores da flora indigena e representantes da zona temperada aqui aclimados. Acreditamos que tal diferença fundamental não existe, se considerarmos apenas o gráu de curvatura das coleoptiles de aveia provocado numa mesma data por materiais provenientes de diversas especias. Mas, por outro lado, cremos que as flutuações anuais de todas as arvores aqui observadas, independentemente da origem, apresentam algumas diferenças em comparação com as observadas na zona temperada, diferenças provavelmente relacionadas com a benignidade de nosso clima durante o ano todo. Entre essas diferenças, que consideramos tipicas de nossas condições climáticas, queremos destacar as seguintes:

1) As curvas de flutuações de hormônio, relativas a diversas especies, mostraram em São Paulo menor uniformidade do que na

zona temperada. Lá, o inverno interrompe forçosamente a atividade meristemática, e só encontram então um ambiente favoravel á sua propagação as arvores cuja floração e crescimento coincidem com os poucos meses da primavera e do início do verão. Em São Paulo, porém, as condições climáticas são mais amenas durante o ano todo e, em consequência disso, não são excluidas do habitat e da possibilidade de propagação especies que crescem e florescem no nosso outono ou até no inverno. Resulta disso maior diversidade, a respeito da localisação do máximo, nas curvas que representam as flutuações anuais do conteúdo em hormônios de nosass especies arboreas. Pode acontecer, portanto, que entre nós o cambio do *Tecoma* venha a atingir o máximo do teor de hormônios em Outubro, embora o da *Tibouchina* só o alcance em Fevereiro.

2) Durante a estação da sêca, que corresponde ao outono-inverno da zona subtropical, o teor de hormônios do cambio não é, entre nós, necessariamente baixo. Podemos citar outra vez o exemplo da *Tibouchina*, cujo cambio mantem, entre Março e Agosto, um nivel relativamente elevado.

3) O teor de hormônios das plantas tipicas de nossa flora é, aproximadamente, da mesma ordem de grandeza que o de representantes da flora da zona temperada. Isso talvez possa causar extranheza, porque se acreditava, frequentemente, que as plantas tropicais fossem caracterizadas por um desenvolvimento ontogenético especialmente rapido, desenvolvimento que estaria então relacionado com um valor extraordinario de hormônios do crescimento. Que esta suposição não corresponde inteiramente á realidade já se pode verificar não sómente do exame do gráfico (fig. 20), na parte correspondente, por exemplo, aos pontos de culminação apresentados em Fevereiro de 1945 pelos generos *Salix* e *Tibouchina*, mas também do fato de se caracterizarem as essencias florestais, nativas aqui, por um crescimento muito lento, razão pela qual são frequentemente substituidas por outras, originárias de outras zonas climáticas. Com esta experiência da pratica florestal concordam pois plenamente os resultados que obtivemos, por exemplo com o *Eucalyptus* e o *Tecoma*.

Um característico que se deve porém frizar neste item é que nas plantas da flora brasileira não há quase periodos do ano em que a presença de hormônios no cambio não possa ser demonstrada. Extende-se, provavelmente, a atividade meristemática de nossas essencias florestais a um periodo mais dilatado do que nas arvores da zona temperada, observadas no seu ambiente natural.

4) Também estas arvores da zona temperada, quando transferidas para as nossas condições climáticas, manifestam maior elasticidade nas flutuações dos hormônios no cambio do que nos paises de origem. Essas flutuações são caracterizadas por diferenças muito acentuadas entre as estações. Assim, por exemplo, não dispomos de dados para verificar, no cambio de *Populus*, entre Fevereiro e Maio, qualquer presença de hormônios ativos, embora tudo leve a crer, pelas observações nas datas anteriores, que o teor destas substâncias seja baixo durante esses meses; ao contrario, o teor de hormônios no cambio de *Salix* provou ser alto justamente nesses meses de Fevereiro, Abril e Maio. De acordo com as já referidas observações dendrográficas de MacDougal, estas duas arvores muito se assemelham em suas reações, pois parecem seguir ciclos de crescimento bem analogos entre si.

5) Como outra consequencia de nosso clima mais clemente e de nossa situação sob o tropico de Capricornio pode ser considerado o fato de, numa grande parte das arvores que estudamos, o máximo do teor de hormônios coincidir com o início da primavera (*Ficus, Salix, Populus, Tecoma*) ao passo que nos paises da zona temperada, nos quais em geral os meses da primavera se definem por temperaturas ainda muito baixas, as curvas correspondentes ás flutuações anuais do teor de hormônios do crescimento, no cambio, raras vezes atingem o ponto de culminação antes do fim da primavera ou do início do verão (vide Söding, 26, 1937, fig. 5, p. 653 e Avery, Burkholder e Creighton, 1, 1937 a, figs. 1 e 7, p. 52 e 57).

Após ter tentado, nos ultimos parágrafos, esclarecer as flutuações anuais do teor de hormônios no cambio, comparando as curvas que obtivemos nas nossas experiencias com as encontradas nos trabalhos de outros autores, queremos ainda referir as eventuais relações existentes entre o teor de hormônios e as diversas fases do desenvolvimento ontogenético das plantas.

É necessario lembrar essa relação, porque de outra forma poder-se-ia pensar que as flutuações anuais do conteúdo dessas substâncias no cambio nada mais fossem do que a consequencia diréta da alteração do clima nas diferentes estações do ano. É fato sabido, porém, que o seu teor não é influenciado apenas por condições externas, relacionadas com as estações do ano, mas também por fatores internos, dependentes da respectiva fase do desenvolvimento da planta. As fases da brotação, floração e frutificação, por exemplo, são capazes de exercer uma nitida influencia no conteúdo de hormônios do cambio, influencia relativamente independente da dos fatos externos.

Não vamos entrar aqui na discussão da influencia que botões de fôlhas em desenvolvimento e novas fôlhas exercem no teor de hormônios do cambio; nossos dados servem apenas para confirmar as já numerosas indicações da literatura, relativas á existencia de tal influencia.

Onde maior diversidade existe, todavia, é ainda em relação á influencia da floração. Desde já deve-se esclarecer que este problema é de carater bem complexo. Isso se entende perfeitamente quando se considera que a influencia mais direta da floração ou frutificação na formação de hormônios do crescimento verifica-se nos proprios orgãos de reprodução.

Por isso muitos autores visaram, em seus estudos, apurar as variações do teor de hormônios nas anteras, no ovulo e no fruto. Dentre esses autores destacamos MEYER (20, 1936) e WITTVER (33, 1943) que, por metodos de extração completa, estudaram o teor de hormônios nas fases sucessivas do desenvolvimento dos orgãos sexuais femininos do milho, tomateiro, etc.; e GUSTAFSON (11, 1939 a; 12, 1939 b) que visou obter dados relativos ao teor de auxina dos ovarios e dos frutos partenoçarpicos de diversas plantas, como laranjeira, videira e outras mais. Verificaram esses autores, em resumo, que os proprios orgãos de reprodução, durante certas fases do desenvolvimento, e principalmente as sementes imaturas, caracterizam-se por elevado teor de hormônios do crescimento.

Esse resultado, que se refere ao teor de hormônios dentro dos proprios tecidos dos orgãos de reprodução, não permite, porém, tirar conclusões mais gerais a respeito da influencia que as flôres e os frutos exercem na concentração dessas substancias no pedunculo ou no caule. É, porém, justamente mais a este segundo tipo de observações, concernente á ação global das flôres ou dos frutos, que se referem os nossos ensaios sôbre o assunto.

Vejamos portanto como se explica essa ação das flôres ou frutos. Teoricamente, um nivel elevado de hormônios na flôr poderia ser relacionado tanto com um empobrecimento, como com um enriquecimento dos caules, dessas substancias. No primeiro caso a flôr seria um centro de consumo, para onde afluiriam essas substancias também de outros orgãos; ao passo que no segundo caso a flôr representaria um centro de produção, do qual se daria também a translocação para as partes vegetativas. Além disso, existe ainda a possibilidade de que os orgãos de reprodução constituam tanto centros de consumo como de produção dos hormônios.

Para decidir qual dessas possibilidades corresponde eficientemente á realidade, resumiremos em primeiro lugar os resultados de trabalhos de outros autores, que visaram acompanhar as flutuações do teor de hormônios do crescimento nos ramos florais e nos eixos de inflorescências. Vamos destacar, entre os estudos já publicados a esse respeito, as pesquisas em que foi feito uso do método da difusão natural no agar. Por exemplo, num estudo dedicado á verificação da distribuição dos hormônios do crescimento dentro dos diversos orgãos da composta *Heliopsis laevis*, SÖDING (27, 1938) chegou á conclusão de que as flôres — e principalmente os botões das flôres — contêm provavelmente grandes quantidades de hormônios, cuja presença, entretanto, só dificilmente pode ser demonstrada pelo método de difusão natural em agar. SÖDING admite mesmo que a flôr e o fruto retêm, de qualquer maneira, o hormônio, a tal ponto que só em casos excepcionais esta substancia pode-se difundir dos eixos florais para o agar. Ao passo que SÖDING considera os botões de flôres como centros de produção, ele atribue ás flôres já abertas e aos frutos mais uma posição intermediaria entre zonas de produção e de consumo.

Também do método de difusão natural em agar serviram-se AVERY, BURKHOLDER e CREIGHTON (1, 1937 a) nos seus estudos sôbre a distribuição de hormônios em caules de *Aesculus* e *Malus*. Verificaram os mencionados autores que, dos eixos de inflorescências de *Aesculus*, difundiu-se, em todo o periodo compreendido entre os meses de Maio a Outubro, quantidade mais elevada de hormônios do que de caules comparaveis com esses eixos, mas só munidos de fôlhas. Neste caso, pois, as flôres e também os frutos representaram um centro de fornecimento de hormônios, também para os eixos.

Os dois trabalhos aqui citados referem-se a plantas cujas inflorescências se desenvolvem após a formação das fôlhas. A concentração respetiva de hormônios, nos eixos das inflorescências, depende por isso, provavelmente, do metabolismo hormonal, que se desencadeia tanto nas flôres còmo nas fôlhas.

Neste particular os resultados mencionados nestes dois ultimos trabalhos são comparáveis com os nossos dados, obtidos em plantas de *Ficus retusa*, *Tibouchina Sellowiana* e *Euphorbia pulcherrima* e que se acham resumidos na tabela 5. Nestas tres especies não há, igualmente, rigorosa separação das fases vegetativa e reprodutiva, de maneira que encontramos normalmente fôlhas e flôres na mesma planta.

Os resultados que obtivemos com estas plantas — e que apenas no nosso caso foram de novo obtidos com o método de raspagem de

cambio — confirmam em grande parte as observações de AVERY e colaboradores. Esses resultados, considerados aliás em detalhe nas pags. 121-122 indicam que a presença de flôres ou inflorescências geralmente resulta num aumento do teor de hormônios do caule. A flôr ou inflorescência age portanto, nesses casos, como centro de produção de hormônios, que fornece um complemento das quantidades fornecidas pelas fôlhas.

Devido á dificuldade de diferenciar a influencia da flôr da da fôlha — nestes casos em que as plantas exhibem simultâneamente fôlhas e flôres — incluimos nos nossos estudos também duas especies arboreas, nas quais a floração precede consideravelmente o desenvolvimento das fôlhas. Esperavamos dessa maneira apurar, com mais facilidade, a influencia isolada da floração no teor de hormônios das hastes. Os resultados mostram que provavelmente também naquelas especies em que as flôres abrem antes das fôlhas, os orgãos reprodutores não desempenham sempre o mesmo papel com relação á produção de hormônios. No caso da *Erythrina,* por exemplo (que pode ser comparado com o de *Heliopsis,* estudado por SÖDING) a inflorescência representa mais um centro de consumo, ou pelo menos de retenção de hormônios, do que uma fonte de produção. Nesta planta só a presença de fôlhas no caule esteve relacionada com um alto teor de hormônios.

O comportamento do *Tecoma,* por outro lado, corresponde mais ao outro extremo, isto é, á possibilidade de constituir a flôr um verdadeiro centro de produção também para a haste. A elevada concentração de hormônios, que encontramos no nosso ensaio de 4/9/45, no cambio de hastes desprovidas de fôlhas mas munidas de flôres e frutos, indica que nesta planta existe de fato uma correlação positiva entre a floração e a concentração de hormônios no cambio do caule. Este resultado confirma, pois, as observações de AVERY e outros, realizadas em *Aesculus Hippocastanum,* completando-as devido á vantagem oferecida pelo nosso material, de apresentar uma nítida separação entre as fases vegetativa e de reprodução.

CONCLUSÃO

Efetuamos experiências de difusão e de determinação do teor de hormônios do crescimento em diversas especies indigenas brasileiras e em algumas outras aclimadas ao nosso ambiente. Estas experiências dão a impressão de que, nas condições do nosso teste, maior simplicidade de execução e uniformidade de distribuição de hormônios do crescimento foi obtida com raspagem de cambio do que por difusão natural de orgãos intatos.

Baseados nas determinações de um teor relativamente elevado de hormônios do crescimento nas hastes, e também nos caracteres fisiológicos especiais exhibidos pelo salgueiro (*Salix babylonica*), quaresmeira (*Tibouchina Sellowiana*), choupo (*Populus nigra*), "flôr de papagaio" (*Euphorbia* ou *Poinsettia pulcherrima*), ipê amarelo (*Tecoma ochracea*), "canivete" (*Erythrina speciosa*) e *Ficus retusa*, achamos estas especies particularmente interessantes para estudos das influencias da folhagem, da floração e das flutuações anuais, no conteúdo das referidas substancias no cambio.

Em resumo, estas nossas observações preliminares das determinações de hormônios do crescimento têm provavelmente seu principal valor como contribuições ao conhecimento dos habitos destas especies no nosso ambiente ou quando transplantadas a lugares com condições similares.

Acreditamos que estudos desta natureza poderão contribuir para a solução de problemas de grande interesse pratico, como por exemplo a propagação de plantas de importância economica e a modificação do seu desenvolvimento ontogenético.

RESEARCH CONCERNING GROWTH HORMONE DETERMINATIONS IN SUB-TROPICAL PLANTS

Abstract

Determinations were made on the growth hormone contents in a series of typical and acclimatized plants of the subtropical zone (State of São Paulo, Brazil), ennumerated on page 102-103.

The technique of extraction adopted was the natural diffusion of free hormones from the complete segment of organs, or from the scrappings of cambium, to the agar.

The growth hormone contents was determined by the WENT'S *Avena bending test as modified by* SÖDING *(24, 1935) and adapted to our conditions (fig. 1). This method, though perhaps not less sensitive or accurate than the Avena bending test, is far simpler to carry out as it does not require a dark room equipped with special apparatus for the control of temperature and humidity.*

Our experiments were tried out in a room of our principal building in São Paulo, where there are no notable variations in temperature and humidity. All manipulations (except the hormone diffusion into the agar, certain phases of the growth of the test plants and the test itself) were effected under diffused daylight conditions of our Laboratory.

The diffusion of hormones into the agar was done in a small dark moist chamber (Plate 4, fig. A).

The Avena seedlings (lineage n.º 66, not a pure line, obtained from the Experimental Station "Alfredo Chaves" of Rio Grande do Sul, Brazil) grew in damp sawdust, in clay pots of 7.5 cm in diameter instead of in the usual glass holders. These pots were kept for three days at the bottom of tall black cardboard cylinders 45 cm high by 20 cm in diameter (Plate 4, fig. A), during which time the coleoptiles were receiving light from above only. About eight hours before the test the cylinders were covered so as to completely prevent light from reaching the Avena plants.

During the test itself the same black cardboard cylinders were used to cover inverted glass cylinders, inside of which were the pots with the decapitated Avena coleoptiles to which were applied, unilaterally, the small blocks of agar containing the hormones to be tested. Two hours later readings were taken. The angle of curvature was determined indirectly with a glass plate over a transfer as decribed by SÖDING *(23, 1934).*

The small blocks of agar, applied unilaterally, measured 2 × 3 × 1 mm. The larger agar plates, on which was carried out the diffusion of the hormones of the plant organs, measured 8 × 9 × 1 mm and were obtained in original glass moulds (Plate 4, fig. A).

Instead of decapitation scissors we used a simple, adapted penknife (Plate 4, fig. A) for a single trimming of the coleoptile tips or for cutting the agar plates into the twelve smaller blocks.

Small glass rods with curved tips served to apply the agar blocks to the coleoptiles (Plate 4, fig. A).

The main results presented in this article may be summarized as follows:

1. The natural diffusion of complete organs (leaves, stalks, shoots, flowers and fruits) didn't show generally good results easily reproduced. This was probable due, in part, to the difficulty of maintaining contact between the organ and the agar during the diffusion technique. Table 1, which presents results in a conventional manner, shows that the complete organs most fully studied, and which in fact proved to be the most favorable for these studies, were the new shoots (figs. 2, 3, 4). Leaves, flowers and fruits were not submitted to long study, and evidenced small content of hormone (figs. 4, 5, 6, 7).

2. The diffusion from the scrappings of cambium showed better and more uniform results, specially in tests on varieties

characterised by a low content of hormone. Table 2 exhibit, in progressive order, the total means of curvatures obtained with the scrappings of cambium from the stems of the 30 genera and species of plants studied (figs. 8, 9, 10, 11, 14).

3. Because a relatively high hormone content, was shown, and because of its special physiological characteristics, we selected 7 amongst the species included in Table 2, and mentioned on page 115-116. With most of these we made experiments to observe the influence of foliage, of the age of branches, of the flowering, and of the periodicity, in the hormone content of cambium.

4. On determining the influence of foliage we found a pronounced diminution of contents of free auxin in the leafless stems (table 3). This decrease would run as much as 1/4 of the concentration found in similar stems carrying leaves. Such results were more perceptible in the Erythrina (figs. 17, 18).

5. We obtained higher curvature values from new stems scrappings of cambium than from older stems (see Table 4, and figs. 12, 13). The differences in concentration between cambium from branches of varying ages were most notable in the species Populus and Tecoma.

6. As to the influence of flowering, the results shown in Tables 5 and 6 demonstrate in general an increase in the hormone content in trees that have flowers. In some species not showing a clear-cut difference between the vegetative and reproductive phases, the flower or the inflorescence acts probably as a center for the production of hormones, and furnishes a complement to the quantities supplied by the leaves (Table 5, and figs. 15, 16). In the other arboreous species, in which flowering considerably precedes the development of the leaves (Table 6) the behavior varied: In Erythrina the presence of leaves contributed much more to the increase of hormone content than the existence of inflorescence (figs. 17, 18); but in Tecoma the beginning of flowering coincided in fact with the increase of this content (figs. 13, 19).

7. In our fig 20, which represents the probable production and annual distribution of growth hormone in cambium in two typical plants of the Brazilian flora (Tibouchina and Tecoma), in two from the temperate zone (Populus and Salix) and in one from the tropics of the Old World (Ficus), studied under the same conditions, we see that fluctuation curves show less uniformity than in the temperate zone. However, the hormone content in plants typical of our flora is approximately of the same

order of magnitude as for representative of flora of the temperate zone. The peak of hormone concentration, show in Avena curvatures degrees, was reached in four of the plants studied, precisely at the beginning of spring. In summer very low hormone contents were generally found. During the dry season, which corresponds to fall and winter in the subtropical zone, the hormone content in cambium is not necessarily low, as is proved by the example of the Tibouchina.

The behavior of Populus and Salix in São Paulo was not parallel, as stated by MacDougal *(19, 1936) for conditions found in Washington D. C. Salix reacted here more strongly to the outside climatic conditions of the moment, while Populus appears to react not only to such conditions, but also to an internal periodicity typical in plants of the temperate zone.*

BIBLOGRAFIA

1 — Avery, G. S., Jr., P. R. Burkholder and H. B. Creighton — 1937 a — Production and distribution of growth hormone in shoots of Aesculus and Malus, and its probable role in stimulating cambial activity. *Amer. Jour. Botany*, 24: 51-58.

2 — Avery, G. S., Jr., P. R. Burkholder and H. B. Greighton — 1937 b — Nutrient deficiencies and growth hormone concentration in Helianthus and Nicotiana. *Amer. Jour. Bot.*, 24: 553-557.

3 — Avery, G S., Jr. — 1940 — Chemical factors of plant growth. *Growth Supplement:* 55-74.

4 — Avery, G. S., Jr., and Louise Pottorf — 1945 — Polyploidy, auxin and nitrogen in green plant tissue. *Amer. Jour. Bot.*, 32: 669-671.

5 — Bennett, J. P. and Folke Skoog — 1938 — Preliminary experiments on the relation of growth promoting substances to the rest period in fruit trees. *Plant Physiol.*, 13: 219-225.

6 — Boysen Jensen, P. — 1936 — Growth hormones in plants. Authorized transl. and revision by G. S. Avery, P. R. Burkholder, H. B. Creighton and B. A. Scheer. 268 p. New York: McGraw — Hill.

7 — Czaja, A. T. — 1934 — Der Nachweis des Wuchsstoffes bei Holzpflanzen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 52: 267-271.

8 — Dolk, H. E. and K. V. Thimann — 1932 — Studies on the growth hormone of plants. I. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Washington), 18: 30-46.

9 — Fagundes, A. Barcellos — 1938 — A influencia dos fitohormonios sinteticos sobre o enraizamento de estacas. *Anais da 1.ª Reunião Sul-Americana de Botanica* (Brasil) 3: 271-292.

10 — Goodwin, Richard H. — 1937 — The role of auxin in leaf development in Solidago species. *Amer. Jour. Bot.*, 24: 43-51.

11 — Gustafson, F. G. — 1939 a — The cause of natural parthenocarpy. *Amer. Jour. Bot.*, 26: 135-138.

12 — GUSTAFSON, F. G. — 1939 b — Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development. *Amer. Jour. Bot.*, 26: 189-194.

13 — GUSTAFSON, F. G. — 1946 — Influence of External and Internal Factors on Growth Hormone in Green Plants. *Plant Physiology*, 21: 49.

14 — HAAGEN-SMIT, A. J. — 1939 — Über die Physiologie und Chemie der pflanzlichen Wuchshormone. In Mellanby, E. & L. Rüzicka, *Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung*. Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft, 2: 347-380.

15 — HEIMERL, A. — 1934 — Nyctaginaceae. In Engler-Prantl, *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 16 c: 86.

16 — LAIBACH, F. und F. MEYER — 1935 — Über die Schwankungen des Auxingehaltes bei *Zea mays* und *Helianthus annuus* im Verlauf der Ontogenese. *Senckerbergiana*, 17: 73-86.

17 — LEFÈVRE, JOSEPH — 1938 — Sur la présence normale d'acides indoliques et particulierement de l'acide indol-3-acetique dans diverses plantes superieures. *C. R. Acad. Sciences* (Paris), 206: 1675-1677.

18 — LEFÈVRE, JOSEPH — 1939 — Observations sur la teneur de divers organes vegetaux en acide indol-3-acetique. *C. R. de la Soc. de Biol.* (Paris), 130: 225-227.

19 — MACDOUGAL, D. T. — 1936 — Studies in tree-growth by the Dendrographic Method. 256 p. Carnegie Institution of Washington, Publ. n.º 462.

20 — MEYER, FRANZ — 1936 — Über die Verteilung des Wuchsstoffes in der Pflanze während ihrer Entwicklung. Dissertation. Johann Wolfgang Goethe Universität zur Frankfurt a. M., 39 p., Abs. in *Ber. Phys. u. Pharm.*, 98: 234.

21 — SCHENCK, H. — 1893 — Beiträge zur Biologie und Anatomie der Lianen, im Besonderen der in Brasilien einheimischen Arten. II. Beiträge zur Anatomie der Lianen. p. 56. Jena.

22 — SÖDING, H. — 1926 — Über den Einfluss der jungen Inflorescenz auf das Wachstum ihres Schaftes. *Jahrb. Wiss. Bot.*, 65: 611-635. Abs. in *Ber. u. d. Wissensch. Biologie*, 1: 792.

23 — SÖDING, H. — 1934 — Über die Wachstumsmechanik der Haferkoleoptile. *Jahrb. Wiss. Bot.*, 79: 231-255.

24 — SÖDING, H. — 1935 — Die Ausführung des Wentschen Auxintestes am Tageslicht. *Ber. dtsch. Bot. Gesellschf.*, 53: 331-334.

25 — SÖDING, H. — 1936 — Wirkt der Wuchsstoff artspezifisch ? *Jahrb. Wiss. Bot.*, 82: 534-554.

26 — SÖDING, H. — 1937 — Wuchsstoff und Kambiumtätigkeit der Bäume. *Jahrb. Wiss. Bot.*, 84: 639-670.

27 — SÖDING, H. — 1938 — Wuchsstoffbildung und Wuchsstoffverteilung in der Compositenstaude Heliopsis laevis im Laufe einer Vegetationsperiode. *Flora* (Jena). N. F., 32: 425-446.

28 — THIMANN, K. V. and FOLKE SKOOG — 1934 — On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in Vicia faba. *Proc. Roy. Soc.* (London), B., 114: 317-339.

29 — VAN DER WEIJ, H. G. — 1933 — Über Wuchsstoff bei Elaeagnus angustifolius. *Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam*, 36: 760-761.

30 — VAN OVERBEEK, J. — 1933 — Wuchsstoff, Lichtwachstumsreaktion und Phototropismus bei Raphanus. *Rec. Trav. Bot. Néerl.*, 30: 537-626.

31 — VAN OVERBEEK, J., MARCO A. TIÓ, LUIS E. GREGORY, ELBA M. SANTIAGO DE VÁZQUEZ — 1943/1944 — Investigaciones fito-fisiologicas. *Informe anual del Director del Instituto de Agricultura Tropical de Puerto Rico*, p. 14-39, 50-66.

32 — WENT, F. W. — 1928 — Wuchsstoff und Wachstum. *Rec. Trav. Bot. Néerl.*, **25**: 1-116.

33 — WITTVER, S. H. — 1943 — Growth hormone production during sexual reproduction of higher plants. *Missouri State Res. Bull.*, p. 371.

34 — ZIMMERMANN, W. A. — 1936 — Untersuchungen über die räumliche und zeitliche Verteilung des Wuchsstoffes bei Bäumen. *Z. Bot.*, **30**: 209-252.

35 — ZIMMERMAN, P. W. — 1942/1943 — Fitohormonas. *Informe anual del Director Instituto de Agricultura Tropical de Puerto Rico*, p. 12-21.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 4

Fig. *A* — Dispositivos e aparelhamento utilizados em nossos ensaios para a difusão e a determinação quantitativa de hormônios do crescimento de plantas.

Fig. *B* — Vaso de barro, com as coleoptiles de aveia já prontas para serem medidos os angulos de curvatura. (½ do tamanho natural).

Estampa 5

Fig. *C* — *Tecoma ochracea*, arvore em início de brotação. Nota-se a brotação típica da primavera, após a fase do florescimento, da qual restam ainda algumas flôres e frutos. De plantas neste estado obtivemos concentrações nitidamente mais elevadas de hormonios, do que de plantas já completamente brotadas. (Fot. em 31/10/46).

Fig. *D* — *Tibouchina Sellowiana*, arvore em florescimento. Nota-se a presença concomitante de fôlhas e flôres na mesma planta. De plantas neste estado obtivemos maiores concentrações de hormonios do que de plantas apenas com fôlhas, examinadas na mesma época. A enorme quantidade de flôres não é muito visivel na fotografia devido á sua coloração roxa, típica.

B

A

C

D

Vol. 17 — Art. 8 Dezembro de 1946

ALIMENTAÇÃO DAS PROTERONINFAS DE "BOOPHILUS (UROBOOPHILUS) MICROPLUS CAN., 1888" (IXODIDAE) COM OS RESTOS NECRÓTICOS DA REAÇÃO TISSULAR DO HOSPEDEIRO

POR

M. P. de Castro & C. Pereira

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto e estampas 6-11

INTRODUÇÃO

No decorrer das tentativas de infestações experimentais em orelha de coelho por proteroninfas de *B. microplus*, foi observado o fato altamente interessante, e parece que assinalado agora pela primeira vez em carrapatos, das proteroninfas ingurgitarem conservando uma tonalidade pálida de coloração plúmbea, quase branca, o que contrasta nitidamente com a côr vermelho-negro das de todas as outras espécies às quais encontramos referências.

Tal peculiaridade de coloração parecia indicar um repasto não sanguineo, o que se confirmou pelo exame do conteúdo do aparelho digestivo das proteroninfas ingurgitadas, e pela facilidade de diafanização delas (Estampa 11, fig. *K*).

Julgando tratar-se de comportamento anômalo em hospedeiro inadequado, procedemos à infestação de bezerros, verificando, surprezos, que se repetia o mesmo fenômeno observado em orelha de coelho.

Revendo a bibliografia do assunto encontramos a única referência de TRAGER (1939) que, em proteroninfas de *Dermacentor variabilis* SAY, 1821, alimentadas em orelha de cobaia, observara comportamento normal nas primo-infestações; entretanto, ao repetir as infestações poucos dias depois, na mesma ou na outra orelha do mesmo animal, não só obtinha menor proporção de proteroninfas ingurgitadas normalmente, como ainda algumas em repleção parcial e com a mesma palidez observada sistematicamente por nós, em nosso material, o que o levou a interpretar o fenômeno como consequência de uma reação tissular do hospedeiro, com consequente restrição alimentar para o parasito.

Ora, os resultados a que chegamos não comportavam o mesmo tipo de explicação, em primeiro lugar porque eram rigorosamente uniformes, tanto no hospedeiro normal como no experimental, em

segundo por serem independentes de qualquer infestação previa dos hospedeiros, e tambem porque, se fosse este um processo anormal, as proteroninfas não sofreriam ecdise, o que se dá normalmente.

Foi o que nos levou a empreender o estudo histológico das picadas, escolhendo para hospedeiro o coelho, que por ser animal de laboratorio está seguramente isento de quaisquer infestações previas, capazes de lançar confusão entre as reações tissulares à picada e as possiveis reações de imunidade tissular, que pretendemos abordar em outro trabalho.

MATERIAL E TÉCNICA

As proteroninfas foram obtidas no laboratorio, a partir das desovas de fêmeas colhidas em bezerros na Fazenda Mato Dentro, em Campinas, Estado de São Paulo, e postas a sugar em orelha de coelho e no dorso de bezerro.

Conseguimos bom rendimento na orelha de coelho com o aparelho descrito por TRAVASSOS e VALLEJO-FREIRE (1945), ligeiramente modificado pela substituição da tela metálica por perfurações feitas no cartucho de couro.

Os bezerros eram infestados libertando-se em seu dorso grande número de proteroninfas, que escolhiam a vontade os lugares de implantação.

O material para estudo era colhido por meio de biopsias dos segmentos de orelha de coelho ou de pele de bezerro com parasitos, do 3.º ao 5.º dia do inicio da infestação, fixado depois em BOUIN-HOLLANDE, no vácuo, e incluido em parafina com 10% de cêra amarela de abelhas.

Antes de serem cortados, os blocos foram aparados e deixados de môlho em água, na geladeira, de acordo com o método de SLIFER e KING (1933), o que facilita o corte mesmo no material mais fortemente esclerosado.

A maioria dos cortes foi corada pelo método do azul policrômico-eritrosina de MALLORY (1900), e alguns impregnados segundo o método de PEREIRA e MEDINA (1945) (Est. 10, fig. *J*).

O estudo do conteúdo do aparelho digestivo foi feito, parte em material dissecado, parte em toto-montagens após impregnação argêntica pela técnica de PEREIRA e CASTRO (1943).

MECANISMO DA PICADA

A proteroninfa aplica o rostro contra a epiderme, injuriando-a mecanicamente, ao menos no inicio (Est. 6, fig. *A*); assim é perfurada a camada córnea e atingida a granulosa. Devido em parte e

seguramente, ao traumatismo contínuo, e possivelmente tambem à eliminação de saliva dotada de propriedades citotóxicas, dá-se uma enérgica exsudação de plasma, que não só se insinua entre as camadas córnea e granulosa da epiderme, onde coagula e vai constituir uma sapata firmemente implantada, como ainda se projeta para o exterior, envolvendo o conjunto das peças bucais do parasito, onde tambem coagulado assume o perfil de um tronco de cône assentado na base inter-corneo-granular (Estampas 6-9, figs. *A-G*).

O coágulo assim formado, que se apresentou sempre rigorosamente acelular, constitue o mecanismo fundamental de fixação do parasito à pele do hospedeiro, e exibe um grau de desenvolvimento muito maior do que o assinalado em *Dermacentor reticulatus* (FABR., 1794) por TALICE (1930); em *Hemaphysalis campanulata hoeppliana* SCHULZE, 1932 e *Dermacentor sinicus* SCHULZE, 1932 por HOEPPLI e FENG (1931); em *Hyalomma detritum peretrigatum* SCHULZE, 1930 e *Ixodes ricinus* (L., 1758) por HOEPPLI e FENG (1933); em *Dermacentor variabilis* SAY, 1821 por TRAGER (1939); e em *Ixodes persulcatus* SCHULZE, 1930 por VOLODINA (1942), onde apenas reveste o rostro do parasito; e semelhante ao observado por HOEPPLI e FENG (1933) em *Boophilus* sp.

Com a erosão da camada córnea da epiderme e a necrose das camadas granulosa e de Malpighi, o exsudato seroso insinua-se radialmente, sob a camada córnea, a partir do ponto de picada, de tal modo que o coagulo de fixação do parasito delamina a camada córnea, num raio que varia entre 70 a 140 micra.

A espessura desse coágulo aumenta bastante da periferia para o centro, continuando-se no tronco de cône de fixação do parasito, onde chega a atingir 65 a 100 micra de altura; disso resulta que as lâminas desagregadas da camada córnea são gradativamente arrebitadas, á medida que se dirigem da periferia para o centro.

A camada de Malpighi adjacente ao círculo necrosado apresenta uma reação característica, que se traduz por aceleração no ritmo das mitoses da camada basal, o que acarreta seu espessamento e ligeira acentuação da sua basofilia; além disso nota-se aumento do número de células da camada granulosa, com consequente incremento do processo de queratinização.

Ainda antes de se estabelecer a solução de continuidade da epiderme no ponto da picada, já se notam as primeiras manifestações morfológicas de desorganização do derma, traduzida inicialmente por um edema, como já observaram GREGSON (1937) e WINER e STRAKOSCH (1941) em *Dermacentor* sp., que irradia do centro de

irritação, mas atinge pequeno raio (Est. 7, fig. *C*). A pequena área precocemente edemaciada já apresenta as primeiras manifestações de necrose.

A partir de então a velocidade do fenômeno vai acelerando, caracterizando-se por congestão dos vasos vizinhos, aumento da quantidade de granulocitos heterófilos no seu interior, que é seguido de perto pelo aumento tambem das células linfoides migradoras; paralelamente, vai ocorrendo a infiltração do tecido conjuntivo, a principio pelos granulocitos heterófilos, começando depois a avultar tambem as células do sistema linfoide-macrofágico, de tal modo que o quadro inicial de edema restrito passa a ser sobrepujado por um fenômeno mais amplo de infiltração celular de caracter sub-agudo, cada vez mais densa, que tende a bloquear a circulação dos pequenos vasos locais (Est. 7, fig. *D*).

Enquanto a infiltração celular é intensificada, vai-se dando, paralelamente, a difusão do processo de necrose no derma, que continua tendo como centro de irradiação o ponto de implantação do parasito, podendo atingir até cerca de 370 micra de raio (Est. 8, figs. *E-F*, e est. 9, fig. *G*).

Nunca foram observadas as áreas hemorrágicas referidas por TALICE (1930), HOEPPLI e FENG, (1931), GREGSON (1937) e por TRAGER (1939) como características de picadas das proteroninfas de espécies do gênero *Dermacentor* KOCH, 1844, e que vão constituir a fonte de sangue desses carrapatos. No caso de nossa espécie, a vasodilatação é sempre mais recuada, havendo a obliteração sistematica dos vasos na zona de necrose, de tal maneira que as hematias disponiveis são apenas as que deixaram os vasos por diapedese, em consequencia da ativa migração dos leucocitos.

Este quadro de reação tissular parece-nos explicar satisfatoriamente o mecanismo pelo qual as proteroninfas de *B. microplus* CAN., 1888, não podem ter acesso a nenhuma fonte de sangue, nem mesmo por hemorragia, como acontece com as outras espécies até agora estudadas; seu unico suprimento alimentar é constituido pelo complexo de substâncias resultantes da lise que ocorre na área de infiltração celular aguda, quando atingida pelo intenso processo necrótico que é desencadeado pela emissão de saliva do parasito, progressivamente incrementado pela libertação de novas substâncias citolíticas pelas células necrosadas. Documentam tal fenômeno as áreas de esvasiamento de material necrótico que podem ser observadas no derma (Est. 7, fig. *D* e est. 8, figs. *E* e *F*), ao nivel do ponto de picada, enquanto o parasito permanece grudado ao hospedeiro, e cuja signifi-

cação parece-nos dificilmente ser outra que não a consequência da aspiração da pasta necrótica mais antiga e mais fluidificada pelo aparelho sugador do parasito.

Ao redor da área de reação intensa são mais notaveis as manifestações de vaso-dilatação, ao passo que vai gradualmente decrescendo a infiltração celular, passando a predominar as células linfoides, entremeiadas com fibroblastos, raras células plasmáticas e ainda mais raros granulocitos eosinófilos, que se adensam principalmente ao redor dos folículos pilosos e glândulas sebáceas das vizinhanças, e mais ainda em relação com a vascularização do tecido subcutâneo, geralmente dilatada.

Ainda no decorrer da picada começam a aparecer as primeiras manifestações de reparação, traduzidas pela regeneração do rebordo epidérmico da lesão, que passa a crescer em profundidade, abrindo caminho entre a porção completamente necrosada e os tecidos circundantes, densamente infiltrados por células do sistema linfoide-macrofágico (Est. 9, fig. *H* e est. 10, fig. *I*). Geralmente o emparedamento do foco necrótico termina pouco depois do parasito ingurgitar-se, com isolamento completo dos tecidos atingidos pela necrose, o que acarreta maior intensificação deste fenômeno. Este, já assinalado por WOLLBACH (1919) ao estudar a porta de entrada do germe da febre maculosa, foi estudado por TRAGER (1939), que o considerou o mecanismo caracteristico de defeza do hospedeiro parcialmente imune. Em nosso caso representa apenas um episódio da reação tissular do hospedeiro não imune, de tal maneira que a figura n.º 1 (est. II) de TRAGER corresponderia apenas a uma lesão inicial, ao passo que a fig. n.º 2 da mesma estampa seria um estádio bem mais avançado do processo, descontada a presença das áreas hemorrágicas, que não ocorrem em nosso material.

O processo de isolamento epitelial do fóco necrótico é tão veloz, que em geral, quando surgem as características de um tecido de granulação periférico, já está este protegido sob a convexidade dessa concha de epitélio neoformado, e portanto a coberto de novas injúrias.

Em suma, a cura se processa como em ferida protegida por coágulo ou crosta, o que é realmente o caso, pois a lesão inicial do epitélio torna-se automaticamente obturada pela bucha de coágulo seroso que fixa ao mesmo tempo o parasito à pele.

Assim sendo, dá-se uma eficiente proteção contra a invasão microbiana do foco inflamatório, cujo carater agudo inicial decorre da lesão mecânica do epitélio e da agressividade citotóxica da saliva do carrapato, tornando-se supérfluo invocar o concurso de germes de

supuração como foi admitido por TALICE (1930), e cuja existência não nos foi possivel demonstrar nem nos cortes histológicos nem nas tentativas de isolamento.

Simultaneamente vai-se dando a dispersão do infiltrado celular do derma e do conjuntivo subcutâneo, embora seja muito lenta a volta à normalidade.

À medida que retifica sua linha, o epitélio neoformado torna-se sensivelmente mais espesso do que nas vizinhanças. Quando começa a apresentar uma camada córnea mais diferenciada, é esta que o separa da crosta necrótica; finalmente, quando sua camada córnea começa a dissociar-se num *stractum disjunctum* desprende-se a crosta necrótica, que cai como a "casca" de ferida superficial não infetada (Est. 10, fig. *J*).

Assim, não surge habitualmente oportunidade para a instalação de um tecido cicatricial propriamente dito, pois a lesão é reparada fundamentalmente por regeneração.

DISCUSSÃO

Os fenômenos evidenciados neste trabalho oferecem aspectos interessantes, de um ponto de vista mais geral.

a) ALIMENTAÇÃO DO PARASITO COM RESTOS NECRÓTICOS

Fenômeno desta ordem havia sido referido somente por TRAGER (1939), como já vimos, e apenas em carater excepcional, atribuido a reações tissulares de imunidade do hospedeiro.

De fato o quadro visto repetidas vezes por nós e cuidadosamente acompanhado em cortes seriados, corresponde bem ao descrito por TRAGER (1939) como reações de cobaias parcialmente imunes. Coincide com as nossas observações, exceto quanto à presença de áreas hemorrágicas na lesão, que nunca apareceram em nosso material, o referido por TALICE (1930) em ouriço europeu, por HOEPPLI & FENG (1931 e 1933) em vários animais domésticos e de laboratório, e por GREGSON (1937) em carneiro, como reações normais à picada. Não nos foi possivel consultar os trabalhos de PAVLOVSKII & ALFEEVA (1941), de WINER & STRAKOSCH (1941) e VOLODINA (1942).

TRAGER (1939) refere tambem diversidade de reação a proteroninfas vizinhas, principalmente do epitélio, admitindo que devam correr por conta de peculiaridades individuais na agressividade química dos parasitos. Fatos da mesma ordem foram observados em nosso material, para os quais sugerimos outro mecanismo explicativo: quando se infesta uma orelha de coelho, a-pesar-de todo cuidado posto

na obtenção de resultados uniformes, verifica-se que o momento da fixação de cada parasito difere do dos companheiros às vezes em mais de um dia; alem disso, o tempo que levam para começar a ingurgitar tambem está sujeito a amplas variações individuais. Assim, o momento de começar a experiência de pouco nos serve para assinalar o início do fenômeno, e portanto para nos orientar na interpretação dos resultados.

Por conseguinte, em nosso material, quando parasitos vizinhos estavam provocando reações que diferiam na intensidade, verificavamos que era mais conveniente ligar o fenômeno a diferenças da rapidez em iniciar a sucção, o que se confirmava pela variação no grau de repleção. Este argumento é bem aplicavel às nossas experiências, pois as proteroninfas de *Boophilus* não necessitam de repasto sanguíneo, o que não acontecia no material de TRAGER (1939).

Alem disso, quando uma proteroninfa retardatária se fixa nas proximidades de outra, já poderá encontrar o derma na plenitude de suas manifestações inflamatórias, de modo que a reação à sua picada será ainda mais enérgica do que de costume, o que agrava simultaneamente os fenômenos desencadeados pelo parasito vizinho; o conjunto assume expressão bem mais grave, dando margem à formação de um tecido de granulação mais acentuado, o que talvez se traduza mais tarde pelo advento de um tecido cicatricial.

Em suma, o gênero de alimentação das proteroninfas de *Boophilus* afasta-se completamente de tudo quanto é conhecido nos carrapatos, pois aproxima-se mais do que ocorre nos trombídeos, que se alimentam normalmente por um mecanismo análogo.

b) FIXAÇÃO DO PARASITO POR COÁGULO FIBRINOSO

O coágulo de fibrina que fixa o parasito ao hospedeiro, em nosso caso, apresentou sempre um desenvolvimento muito maior do que o referido pelos autores que estudaram espécies de outros gêneros de Ixodídeos, pois não só reveste a parte do hipostômio que se insinua na solução de continuidade da epiderme, como ainda se projeta externamente numa figura em tronco de cone, que protege até as proximidades da base do capítulo, alem de dissecar em ampla área a camada córnea da camada granulosa da epiderme, entre as quais estabelece extensa base de apoio. Aliás, aspecto semelhante aos vistos por nós já havia sido ilustrado por HOEPPLI & FENG (1933) ao tratarem da ocorrência ocasional do parasitismo natural de *Boophilus* sp. em búfalo dágua.

c) ANALOGIA COM O PROCESSO DE FIXAÇÃO DOS TROMBÍDEOS

Embora não tenhamos ainda experiência pessoal no assunto, parece-nos que o estudo comparativo do mecanismo de fixação da espécie em que trabalhamos com o das já investigadas em outros gêneros de ixodídeos permite projetar certa luz no debatido problema do que TALICE (1929) denominava "histossifão", JOURDAIN (1899) "estilóstoma" e HENKING (1882) "cone sugador" dos trombídeos, isto é, aquele canal escavado num cilindro anhisto, através do qual o parasito aspira o mingau resultante da necrose determinada pela sua picada na pele do hospedeiro.

São diversas as hipóteses sugeridas pela natureza dessa formação, considerando-a alguns um órgão quitinoso do parasito, como o fizeram GUDDEN (1871) e BRANDES (1908), e outros, como forma peculiar de reação dos tecidos do hospedeiro, segundo TROUESSART (1897), BRANDIS (1897), BRÈTHES (1909) e TALICE (1929), outros ainda encarando-a como resultado de uma secreção especial do parasito, de acordo com JOURDAIN (1899) e ANDRÉ (1927).

Ora, a julgar pelas descrições existentes, e principalmente pelas verificações de TALICE (1929), o "histossifão" dos trombídeos deve ser um manguito fibrinoso, comparavel muito provavelmente com o coágulo fibrinoso que promove a consolidação dos carrapatos no hospedeiro e que além da função eventual de conduto para as substâncias nutritivas, desempenhará seguramente tambem a de mecanismo fixador ao hospedeiro. Esta conclusão é reforçada pelos resultados obtidos por TALICE (1929) ao tentar dissociar *Trombicula irritans* RILEY da orelha de *Cavia aperea* ERXLEBEN, observando que os parasitos extraidos traziam geralmente grudados os respectivos "histossifões". É provavel que o parasito deva destacar-se naturalmente da crosta de reação do hospedeiro quando esta se retrai, por desidratação, como vimos acontecer nos carrapatos. Tambem em *Boophilus* a retirada prematura do parasito faz que este traga consigo sua sapata fibrinosa (Est. 11, fig. *L* e fig. 1).

d) MECANISMO PROVAVEL DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA

São de conhecimento geral as inflamações locais determinadas pelas picadas de carrapatos, que às vezes podem agravar-se pelo advento de infecções secundárias, ou ainda pela inoculação de outros microrganismos patogênicos; deixaremos de lado essas duas complicações de fenômeno, para considerá-lo apenas em sua condição mais simples, como foi a em que o estudamos.

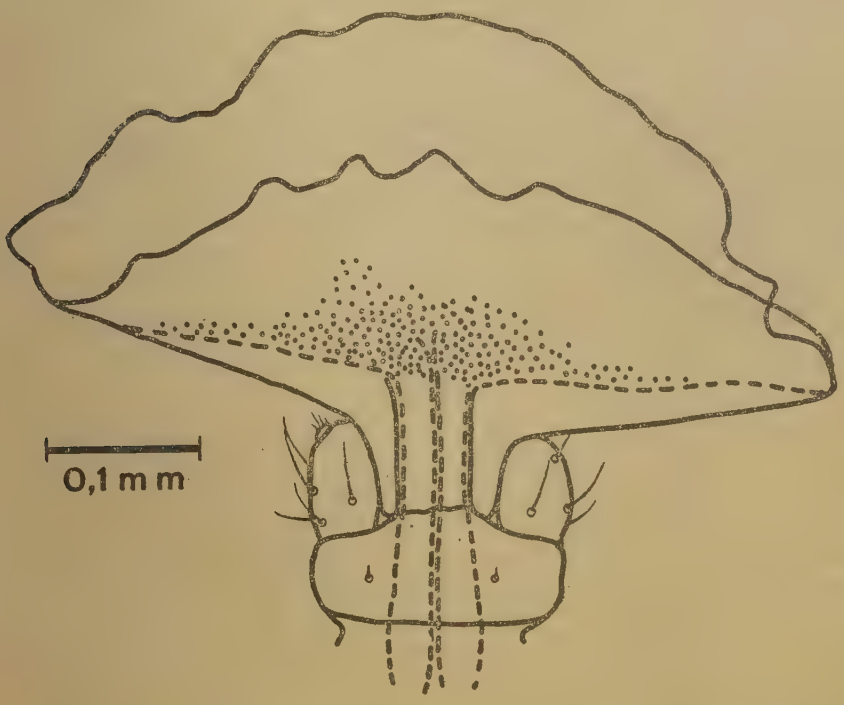


Fig. 1 — Rostro do parasito arrancado prematuramente, trazendo ainda a sapata fibrinosa de fixação ao hospedeiro.

TALICE (1930), impressionado pela resposta leucocitária à picada de carrapato, ficou propenso a crer que se tratasse antes de reação a causas microbianas, como já o admitira VITZTHUM (1929) em relação à picada de trombídeos, do que de ação tóxica de substâncias inoculadas no decorrer da picada. Entretanto, desde o trabalho inicial de DALE e LAIDLAW (1910), que puzeram em evidência a atividade vaso-dilatadora da histamina sobre os capilares, aumentando simultaneamente sua permeabilidade, seguido dos de EBBECKE (1923), provando que a injúria do epitélio de revestimento faz libertar uma substância que, difundindo, irá dilatar os capilares e arteríolas das proximidades, e de LEWIS e GRANT (1924) demonstrando o papel que desempenha nos fenômenos inflamatorios a histamina libertada por células necrosadas, adquiriu este problema realce particular quando DRAGSTEDT (1943) evidenciou a ação ativadora desta substância sobre os fermentos proteolíticos nos tecidos. Ora, RICH e DUFF (1936) mostraram a toxidez local das injeções subcutâneas de tripsina, substância que ROCHA E SILVA (1939) demonstrou ser capaz de libertar histamina nos tecidos, enquanto ROCHA E SILVA e DRAGSTEDT (1941) estenderam tal propriedade, entre várias substâncias, a outros fermentos proteolíticos, por meio da prova do azul tripan.

É sabido que uma "picada de insecto" desencadeia no indivíduo normal a "reação tríplice" de LEWIS e GRANT (1927), característica das manifestações alérgicas agudas da pele, que se distinguem das inflamações sépticas agudas, fundamentalmente pelo seu caracter transitório e menor intensidade. A maior gravidade da reação à picada pelos carrapatos da família dos ixodídeos é consequência do contacto mais prolongado que eles mantêm com o hospedeiro, durante vários dias, no decorrer dos quais têm oportunidade de inocular sua saliva, cujas propriedades irritantes para os tecidos foram demonstradas experimentalmente por PAVLOWSKII e STEIN (1927) e por HOEPPLI e FENG (1933). Estes últimos reproduziram, com injeções de glândulas salivares, o quadro inflamatório da picada por *Dermacentor sinicus* SCHULZE, menos no que concerne ao aparecimento do coágulo de fibrina, e atribuiram esta falha ou à diluição do extrato ou à possivel necessidade de previa ativação da saliva por ocasião da picada. Discordamos desta interpretação, pois o coágulo fibrinoso é evidentemente provocado pela irritação prolongada do epitélio, não podendo portanto surgir em consequência da injeção do extrato.

Portanto, como já foi demonstrado que o teor de histamina na pele é suficiente para desencadear as primeiras manifestações inflamatórias no ponto de picada, podemos conjecturar que, provavelmente, a injúria mecânica do epitélio pelo parasito desencadeia a descarga inicial, responsavel pela exsudação serosa da camada papilar do derma, que vai resultar na sapata fibrinosa que fixa o parasito ao hospedeiro; a seguir emissões sucessivas de saliva lançariam novas ondas de irritantes no ou junto ao derma, provocando e mantendo sucessivamente agravados os fenômenos inflamatórios, inicialmente agudos mas que evoluem rapidamente para a cronicidade e atingiriam o máximo de intensidade com a destruição do denso infiltrado celular. Finalmente, cessada a emissão de substâncias tóxicas e drenada por aspiração parte ponderavel dos subprodutos da lise, intensificar-se-iam os fenômenos reparatórios.

Em relação à não ocorrência das áreas hemorrágicas na reação à picada das proteroninfas de *Boophilus microplus*, em contraste com o que acontece nas espécies de outros gêneros de carrapatos, pensamos que isso deva decorrer da menor agressividade da sua saliva, que desencadearia, portanto, reações de caracter menos agudo. Trata-se entretanto de hipótese ainda por demonstrar.

THE FEEDING OF *BOOPHILUS (UROBOOPHILUS) MICROPLUS* CAN., 1888 (IXODIDAE) ON THE NECROTIC DÉBRIS OF THE TISSULAR REACTION OF THE HOST

Abstract

A histological study of the reaction of the rabbit's ear to tick bites was made. The main features of this phenomenon are discussed, the following conclusions having been arrived at:

a) The parasite attaches itself to the host by means of a clot of fibrine from an exsudation due probably, to the mechanic injury of the skin.

b) The acute inflammatory process is milder than those induced by other species of Ixodidae, because there were no hemorrhagic areas.

c) There were no cases of secondary infection.

d) The tissular reaction in the primo-infestations by proteronymphs of B. microplus is comparable to that occurring in the partially immune host in relation to species of the genus Dermacentor.

e) Proteronymphs of B. microplus do not feed on blood, but on the necrotic débris of the tissular reaction of the host, this fact being not known to occur in any other species of tick.

f) The repair of the tick bite runs in the same way of the healing under blood-clot or crust.

g) The comparison between the feeding of B. microplus and that of the Trombididae led to the assimilation of the "histosyphon" of the latter to the clot of fibrine of the former.

BIBLIOGRAFIA

André, M. — 1927 — Digestion extra-intestinale chez le Rouget (Leptus autumnalis Shaw). *Bulletin Museum Histoire Naturelle Paris*, **33** (6): 509-516.

Brandes, G.* — 1908 — Die Erntemilbe und ihr Saugruessel. *Zeitschrift fuer Naturwissenschaft*, **80**.

Brandis, F.* — 1897 — Ueber Leptus autumnalis. Festschrift 50.º Bestehen Provinz Irrenanst. Nietleben, Leipzig, 1897.

Brèthes, J. — 1909 — El "Bicho Colorado". *Anales del Museo Nacional de Buenos Aires*, **12** (ser. 3): 211-217.

Dale, H. H. e P. P. Laidlaw * — 1910 — The physiological action of beta-imidazolylethylamina. *Journal of Physiology*, **41**: 318-344.

Dragstedt, C. A. — 1943 — Digestion of living tissues by proteolytic enzymes. *Science*, **98**; n.º 2536: 131-132.

Ebbecke, U.* — 1923 — *Pflueger's Archiv fuer die gesamte Physiologie*, **199**: 197.

Ewing, H. E. — 1944 — The trombiculid mites (chigger mites) and their relation to disease. *The Journal of Parasitology*, **30** (6): 339-365.

Gregson, J. D.* — 1937 — Studies on the rate of tick feeding in relation to disease. *Proceedings Entomological Society British Columbia*, 33: 15-21.

Gudden, D.* — 1871 — Ueber eine Invasion von Leptus autumnalis. *Archiv fuer Pathologische Anatomie und Physiologie*, 5 (2): 255.

Henking, H.* — 1882 — Beiträge zur Anatomie, Entwicklungsgeschichte und Biologie von Trombidium fuliginosum Herm. *Zeitschrift fuer Wissenschaft. Zoologie*, 37: 553.

Hoeppli, R. e L. C. Feng — 1931 — Histological reactions in the skin due to ecto-parasites. Dermacentor sinicus P. Schulze from hedgehog, Haemaphysalis campanulata hoeppliana P. Schulze from dog, Cimex letularius and Pediculus vestimenti from man. *National Medical Journal of China*, 17 (4-5): 541-556.

Hoeppli, R. e L. C. Feng — 1933 — Experimental studies on ticks. *Chinese Medical Journal*, 47: 29-43.

Hoeppli, R. e L. C. Feng — 1933 — On some histological changes caused by mites. *Chinese Medical Journal*, 47: 1191-1199.

Jourdain, S.* — 1899 — Le styloprocte de l'uropode végetant et le stylostome des larves de Trombidion. *Archives de Parasitologie*, 2: 28-33.

Lewis, T. e R. T. Grant * — 1924 — Vascular reactions of the skin to injury, II — Liberation of a Histamine-like substance in injured skin. *Heart*, 11: 209-265.

Lewis, T. e R. T. Grant* — 1927 — Vascular reactions of the skin to injury, VII — Notes on the anaphylactic skin reactions. *Heart*, 13: 219.

Parkhurst, H. J. — 1937 — Trombidiosis (infections with chiggers). *Archives Dermatology and Syphilology*, 35: 1011-1034.

Pavlowskii, E. N. e S. P. Alfeeva * — 1941 — Histopathological modifications in the skin of cattle from the bite of the tick Ixodes ricinus. *Trav. Acad. Milit. Med. Kiroff Armée Rouge*, 25: 153-160.

Pereira, C. e H. Medina — 1945 — Viragem da coloração por laca ferrea da hemateina pela prata amoniacal, para o estudo das Leishmanias, principalmente nos tecidos. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 16: (5): 41-48.

Pereira, C. e M. P. de Castro — 1943 — Um metodo de impregnação argentica para o estudo da morfologia interna de invertebrados microscopicos em toto-montagem. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 14 (12): 207-212.

Pereira, C. e M. P. de Castro — 1945 — Contribuição para o conhecimento da especie tipo de "Macrocheles Latr." ("Acarina"): "M. muscae-domesticae (Scopoli, 1772)" emend. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 16 (13): 153-186.

Rich, A. R. e L. Duff * — 1936 — Experimental and pathological studies on the pathogenesis of acute hemorrhagic pancreatitis. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 58: 212-252.

Rocha e Silva, M. — 1939 — Liberation de l'histamine par la perfusion du poumon du cobaye ou moyen de la trypsine. *Comptes Rendus de la Societé de Biologie*, 130: 186-188.

Rocha e Silva, M. e C. A. Dragstedt — 1941 — Observations on the trypan blue capillary permeability test in rabbits. *Journal Pharmacological and Experimental Therapeutics*, 73: 405-411.

Slifer e King — 1933 — Grasshopper eggs and the paraffin method. *Science*, 78, n.º 2025: 366.

Talice, R. V. — 1929 — Sur quelques larves de Trombidinae de l'Uruguay parasite des animaux. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 7 (6): 483-493.

Talice, R. V. — 1930 — Etude histologique de la piqûre de Dermacentor reticulatus (F., 1794). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 8 (2): 173-178.

Toldt, K.* — 1932 — Ueber die Trombidiase in den Alpen. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 36 (33).

Toomey, N.* — 1921 — Trombidiasis. *Urologic and Cutaneous Review*, 25: 598-608.

Trager, W. — 1939 — Acquired immunity to ticks. *Journal of Parasitology*, 25: 57-78.

Travassos, J. e A. Vallejo-Freire — 1945 — Criação artificial de Amblyomma cajennense para o preparo da vacina contra a febre maculosa. *Memorias do Instituto Butantan*, 18: 145-235.

Trouessart, E. L. — 1897 — Note sur l'organe de fixation et de succion du Rouget. *Bulletin de la Societé entomologique de France*, 4: 97-102.

Vitzthum, H. — 1929 — Systematische Betrachtungen zur Frage der Trombidiose. *Zeitschrift fuer Parasitenkunde*, 2: (2): 223-247.

Volodina, Z. V.* — 1942 — Histological observations on skin reaction in white mouse to the bites of Ixodes persulcatus P. Sch. *Zool. J. Moscow*, 21 (5): 179-186.

Winer, L. H. e E. A. Strakosch * — 1941 — Tick bites — Dermacentor variabilis (Say). *J. Invest. Dermatol.*, 4 (3): 249-258.

Wolbach, S. B. — 1919 — Studies on Rocky Mountain spotted fever. *Journal Medical Research*, 41: 1-197.

* Trabalhos não consultados no original.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 6

Corte de orelha de coelho infestado com *B. (U.) microplus*

Fig. *A* — Fixação do parasito à pele por intermédio do coágulo fibrinoso.

Fig. *B* — Perfuração da camada epitelial; edema e ligeira infiltração celular do derma.

Estampa 7

Fig. *C* — Grande aumento a sêco do local da picada da fig. *B*, est. 6.

Fig. *D* — Grande infiltração celular do derma; início de necrose e de alimentação do parasito.

Estampa 8

Fig. *E* — Fase final da alimentação do parasito. Grande área necrosada.

Fig. *F* — Início do processo de reparação. O epitélio começa a se espessar nos bordos da ferida.

Estampa 9

Fig. *G* — Aspecto semelhante ao da fig. *F*, est. 8.

Fig. *H* — Maior progresso da regeneração epitelial.

Estampa 10

Fig. *I* — Estado mais avançado da regeneração epitelial.

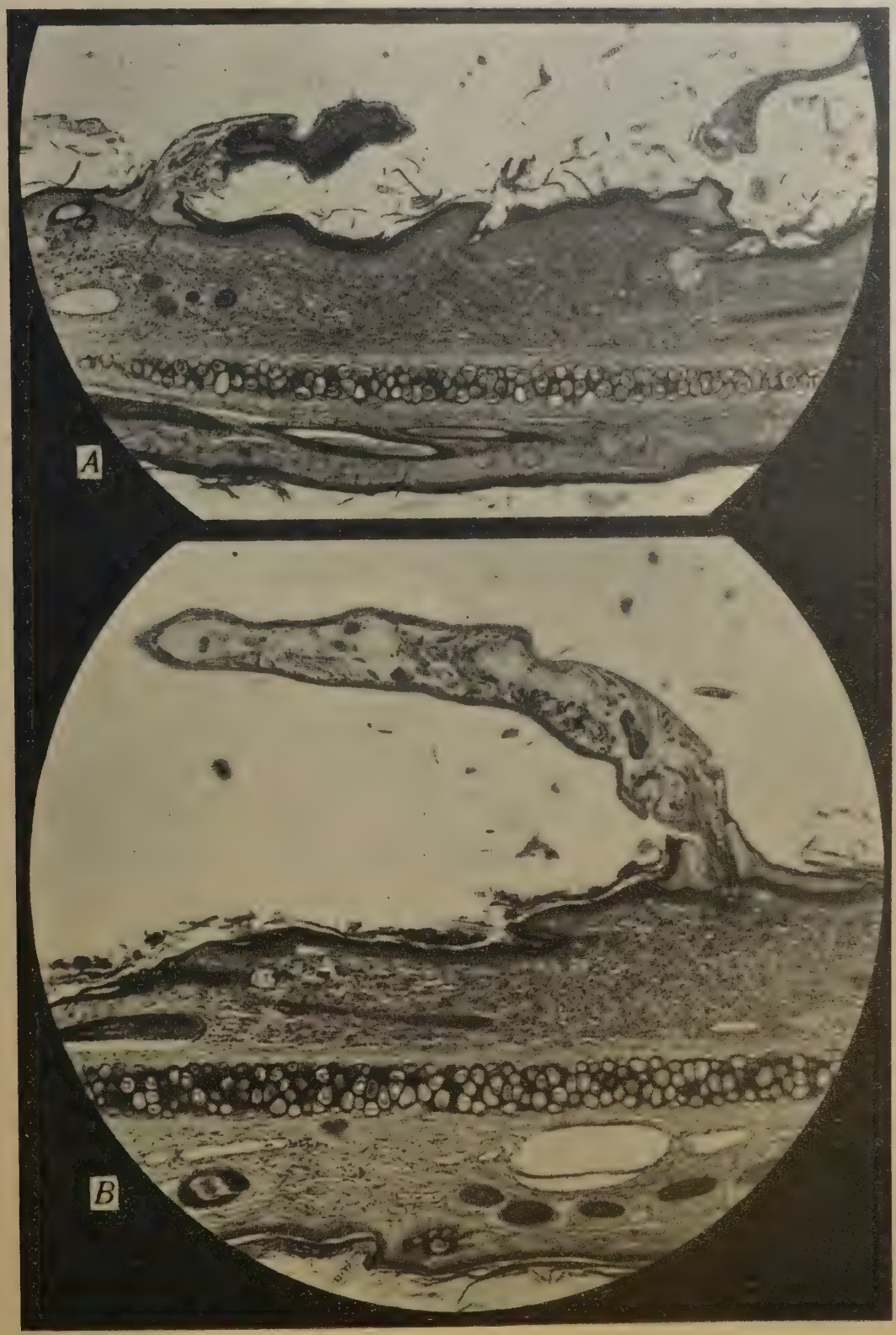
Fig. *J* — Desprendimento da porção necrosada.

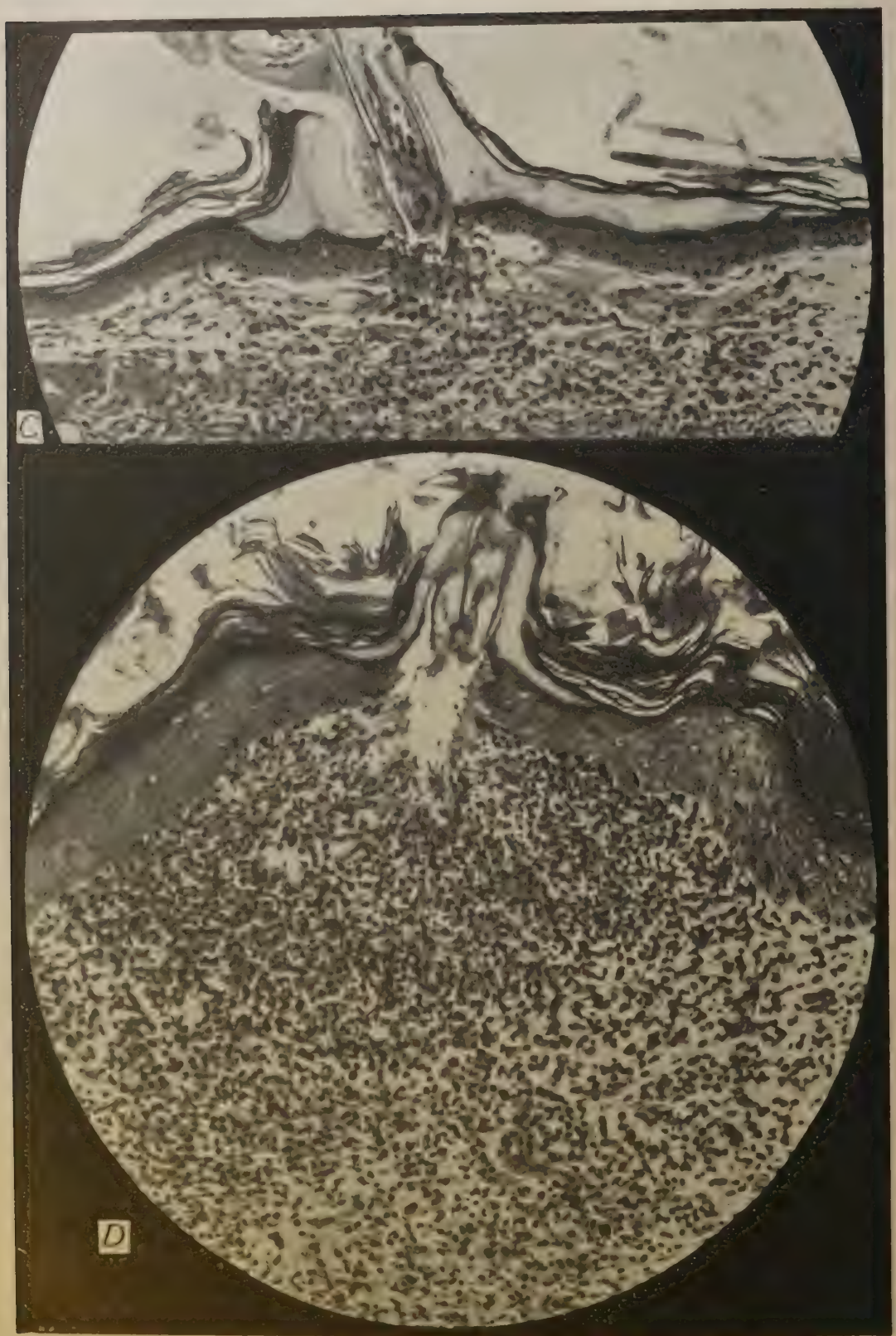
Estampa 11

Fig. *K* — Proteroninfa de *B. (U) microplus* ingurgitada.

Fig. *L* — Rostro do parasito arrancado prematuramente, com a sapata fibrinosa de implantação.

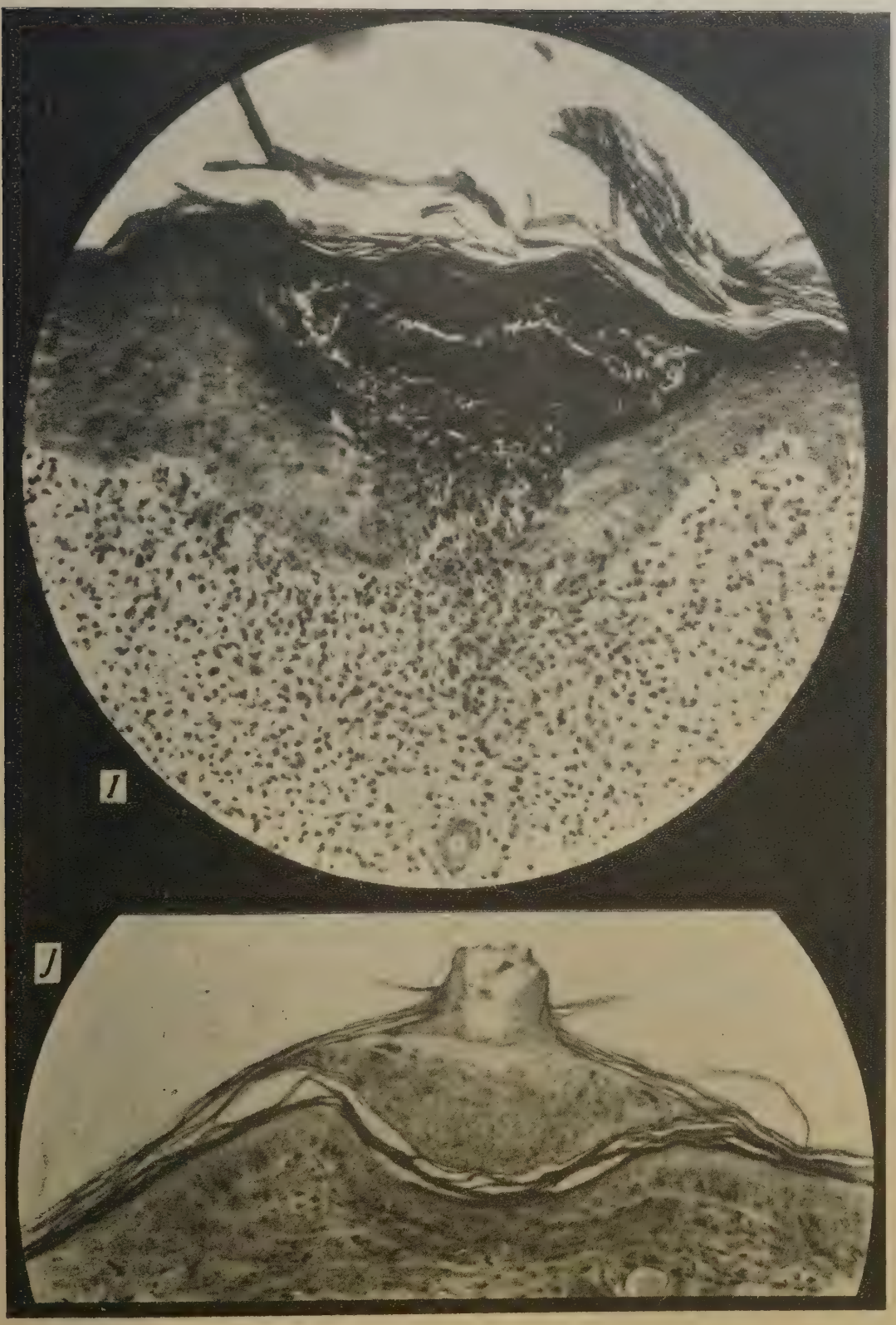
(Fot. A. Federman)


A
B


C
D

E
F

G
H


I
J

K
L

Vol. 17 — Art. 9 Dezembro de 1946

TENTATIVAS PARA SEPARAÇÃO DA SUBSTÂNCIA ANTINEOPLÁSICA QUE SE FORMA NOS LÍQUIDOS DE CULTURA DE "PENICILLIUM NOTATUM"

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em 1945 (1) descrevemos uma série de experiências demonstrando o aparecimento de uma substância antineoplásica no líquido de Czapek-Dox, entre o décimo e o vigésimo dia de cultura de uma amostra de *Penicillium notatum*. Nas condições citadas, êsse líquido tem a propriedade de inativar fragmentos de um tumor transplantavel de camondongos. Enxertados em camondongos, após um contacto de 3 dias com êle, à temperatura de 4°C., êsses fragmentos mostram ter perdido completamente a propriedade de reproduzir o tumor.

Neste artigo é nosso propósito referir outras experiências realizadas com o fim de separar a substância ativa de outros componentes que existem no líquido citado.

As tentativas a serem referidas compreendem três grupos de experiências. No primeiro incluiremos ensáios preliminares feitos para nos certificarmos de uma possível influência da elevação da temperatura e do tempo na atividade da substância a ser isolada. No segundo grupo são consideradas as tentativas da separação dessa substância ativa, por meio dos solventes comuns das gorduras. Finalmente, trataremos das experiências em que empregamos o método de adsorção para separar a parte ativa procurada.

I — EXPERIÊNCIAS PRELIMINARES PARA VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DA SUBSTÂNCIA ANTINEOPLÁSICA

a) Ação do tempo: Tanto o método de dissolução como o de adsorção, como veremos adiante, exigiram certo tempo para seu estabelecimento. Era necessário, pois, assegurarmo-nos da estabilidade da substância antineoplásica, quando o líquido de cultura em que se havia formado era deixado a 4°C. dentro de uma geladeira comum.

Sabendo, pelas observações anteriores, que a atividade antineoplásica se conserva íntegra à temperatura de 4°C. durante duas semanas, mesmo quando o líquido é separado do micélio, fizemos a seguinte

experiência para nos certificarmos da estabilidade dessa substância em período maior:

EXPERIÊNCIA 835: Um líquido de cultura que se demonstrara 100% ativo foi guardado durante 36 dias num frasco de Erlenmeyer na câmara de uma geladeira, a 4°C. e, após êsse tempo, usado para tratamento de 10 fragmentos de um tumor. Ao cabo de 76 horas de contacto, êsses fragmentos foram enxertados em 10 camondongos e outros 10 fragmentos do mesmo tumor, conservados durante o mesmo período em solução salina isotônica, a 4°C., foram enxertados noutro lote de 10 camondongos. Os resultados foram os seguintes:

Nos 10 camondongos que receberam os fragmentos tratados pelo líquido de cultura, guardado durante 36 dias na geladeira desenvolveram-se
2 tumores.

Nos 10 camondongos testemunhas, enxertados com fragmentos tratados pela solução salina isotônica, desenvolveram-se
10 tumores.

A estabilidade da substância antineoplásica, como se vê, conquanto não seja grande, é perfeitamente compatível com as experiências, visto que no decorrer delas o líquido de cultura permanecia separado do micélio e a 4°C., apenas durante um período que no máximo duraria uma semana.

b) Ação do calor: O interesse em se concentrar a substância antineoplásica formada no líquido de cultura indicava a conveniência de se verificar se o efeito antitumoral demonstrado pelo líquido de cultura fresco permanecia quando este era submetido a ebulição.

Foi o que se procurou verificar a seguinte experiência:

EXPERIÊNCIA 796: Um líquido de cultura que havia sido deixado durante 90 dias na geladeira e que, porisso mesmo, já havia perdido parte da sua atividade, foi fervido numa cápsula de porcelana durante uma hora, até ficar reduzido a cêrca de uma quarta parte do volume primitivo. O líquido xaroposo obtido é de coloração verde-seiva pardacenta. Êsse líquido é novamente misturado com certa quantidade de água, de modo a ficar com um volume igual à metade do primitivo. Com êsse material e outra parte do líquido não submetida à concentração, foram tratados separadamente, dois lotes de 6 fragmentos de um mesmo tumor. O contacto do líquido com o tumor se fez numa temperatura de 4°C., durante 96 horas. Enxertados os fragmentos em dois lotes de camondongos foram os seguintes os resultados:

Nos 6 camondongos enxertados com os fragmentos tratados pelo líquido concentrado pelo calor e redissolvido não se desenvolveu nenhum tumor.

Nos 6 camondongos enxertados com os fragmentos tratados pelo líquido de 90 dias, não concentrado nem atuado pelo calor, desenvolveram-se 5 tumores.

A experiência descrita mostra que a concentração pelo calor não elimina a atividade antineoplásica. Porisso que a atividade permanece com a eliminação da água, é para se esperar que este seja um meio para intensificação da atividade antineoplásica.

Estas experiências, feitas para conhecer a possível influência de certos detalhes que deveriam ser tomados em consideração em outras verificações, servem para provar que a substância neoplásica estudada, conquanto se altere com o tempo, mesmo quando conservada em temperatura baixa, apresenta-se praticamente resistente ao calor, podendo ser fervida durante 30 a 40 minutos sem ter prejudicada a sua atividade.

II — TENTATIVAS PARA SEPARAR A SUBSTÂNCIA ANTINEOPLÁSICA POR MEIO DE DISSOLVENTES NÃO MISCIVEIS À ÁGUA

Em analogia com o que se faz para separar a penicilina, o primeiro método lembrado para separar a substância antienoplásica consistiu em obter a sua passagem do líquido de cultura para um solvente volatil do qual pudesse ser facilmente retirada. Não sendo muitos os dissolventes não misciveis à água e passiveis de evaporação, de que dispunhamos, ensaiamos apenas os seguintes:

a) Éter acético: A escolha dêste dissolvente teve por base o seu emprêgo como extrator da penicilina. A técnica tentada para se separar a substância antineoplásica consistiu no seguinte:

EXPERIÊNCIA 934: Um litro de líquido de cultura de *P. notatum* com 15 dias de desenvolvimento, de côr amarela intensa e 100% ativo foi filtrado e agitado com 200 ml. de éter acético num pH ajustado para 6,8. O éter acético foi deixado em contacto com o líquido de cultura a 4°C. durante cinco dias e então separado. Em seguida foi evaporado a 4°C, e o resíduo resultante, suspenso em 50 ml. de solução salina. Essa suspensão é centrifugada, fornecendo primeiramente uma parte solúvel, sobrenadante. Uma nova suspensão em 50 ml. da solução salina é preparada com o sedimento insolúvel que fica no fundo dos tubos de centrifugação. O líquido de cultura do qual foi separado o éter acético é evaporado em banho-maria para eliminar os resíduos do solvente nêle contidos.

Com as três frações referidas foram tratados fragmentos de um tumor, a 4°C., durante 72 horas. Êsses fragmentos são a seguir enxertados em três lotes de camondongos, com os seguintes resultados:

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pela parte da extração em éter acético solúvel em água desenvolveram-se 5 tumores.

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pelo sedimento da extração em éter acético não solúvel em água desenvolveram-se 5 tumores.

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pelo líquido de cultura que restou depois da extração pelo éter acético não se desenvolveu nenhum tumor.

Os dados acima transcritos levam a crer que a substância antineoplásica que se fórma no líquido de cultura do *P. notatum*, ao contrário do que se dá com a penicilina, não é passível de extração pelo éter acético.

b) Éter sulfúrico: Obedecendo ao critério adotado, de se tentar um possível dissolvente não mescivel a água, o segundo meio ensaiado foi o éter sulfúrico, com o qual foi feita a experiência adiante referida:

EXPERIÊNCIA 832: Nesta tentativa empregámos cêrca de um litro de uma cultura de 8 dias, que se demonstrava 100% ativa em seus efeitos antineoplásicos. Depois de separado do micélio, o líquido de cultura foi reduzido a 50% do volume, por ebulição numa cápsula de porcelana. O pH do líquido concentrado foi ajustado a 6,8. Uma parte dêsse líquido foi redissolvida em volume igual de solução salina isotônica. Outra parte foi misturada e agitada com um volume igual de éter sulfúrico com o qual permaneceu em contacto durante cinco dias, à temperatura de 4°C. O éter, depois de separado da parte aquosa, foi evaporado e o resíduo resultante, suspenso em 50 ml. de solução salina isotônica.

A parte aquosa da cultura, separada do éter, também foi evaporada para eliminação dos resíduos do dissolvente nela contidos.

Com as três porções assim preparadas foram tratados fragmentos de um tumor, durante 86 horas, a 4°C. Êsses fragmentos foram separadamente enxertados em três lotes de camondongos, dando êstes resultados:

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pelo líquido de cultura concentrado pela ebulição e redissolvido em água distilada não se desenvolveu nenhum tumor.

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pela suspensão do resíduo obtido com a extração pelo éter, desenvolveram-se
5 tumores.

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pela parte de cultura que não se dissolveu no éter, não se desenvolveu
nenhum tumor.

A prova precedente revela que a substância antineoplásica do líquido de cultura de *P. notatum*, também não passa para o éter sulfúrico quando êste dissolvente é deixado em contacto com êle.

c) C l o r o f ó r m i o : O terceiro dissolvente não miscível à água, ensaiado, foi o clorofórmio, usado de modo seguinte:

EXPERIÊNCIA 829: Para êste ensáio foi utilizado um litro de cultura de 20 dias. Êsse líquido foi bem misturado com 200 ml. de clorofórmio e deixado em contacto com êle durante cinco dias, a 4°C. num pH = 6,8. O clorofórmio foi separado da parte aquosa e evaporado de modo a dar um resíduo que, como os demais, foi suspenso em 50 ml. de solução salina isotônica.

A porção sobrenadante da cultura que esteve em contacto com o clorofórmio também foi evaporada em banho-maria para eliminação dos resíduos do solvente.

Com as duas partes citadas foram tratados dois lotes de fragmentos de tumor, durante cinco dias, numa temperatura de 4°C Os enxertos dêsses fragmentos deram os resultados seguintes:

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pela suspensão do resíduo obtido com a extração pelo clorofórmio desenvolveram-se
4 tumores.

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pela parte do líquido de cultura que esteve em contacto com o clorofórmio desenvolveram-se
5 tumores.

Em 5 camondongos enxertados com fragmentos tratados por uma parte do líquido de cultura, sem nenhuma extração desenvolveram-se
4 tumores.

Vê-se, pelos resultados colhidos, que a experiência foi feita com um líquido pouco ativo. Todavia é razoável admitir-se que o clorofórmio não retira a parte antineoplásica procurada, pois se o fizesse, esta última deveria estar concentrada no resíduo e assim mostrar-se-ia mais ativa na porção resultante da extração.

O conjunto das observações precedentes nos leva a admitir que a substância antineoplásica que se fórma nas culturas de *P. notatum* em líquido de Czapek-Dox não é passível de extração pelo éter acético, nem pelo éter sulfúrico, nem pelo clorofórmio.

III — TENTATIVAS PARA SEPARAR A SUBSTÂNCIA ANTINEOPLÁSICA PELA ADSORÇÃO

Adsorção pelo carvão: O malogro das experiências anteriores e o fato da atividade antineoplásica coincidir com a coloração amarela do líquido de cultura, coloração produzida por um pigmento que é retido quando em contacto com o carvão ativado, fizeram nascer a hipótese de que a substância antineoplásica pudesse ser separada do líquido pelo emprêgo do mesmo adsorvente que retirava o pigmento amarelo das culturas. Com essa idéia em mente realizamos a seguinte experiência preliminar:

EXPERIÊNCIA 831 A: Cêrca de 500 ml. de uma cultura ativa de 15 dias foram misturados com cêrca de um quinto do seu volume de um carvão ativado como é entregue ao comércio pela firma Indústrias Brasileiras de Produtos Químicos. Essa mistura é filtrada, fornecendo um líquido claro e quasi completamente desprovido de pigmento.

Com êsse líquido e com uma parte do líquido de cultura não misturado ao carvão foram tratados durante 72 horas, a 4°C., dois lotes de fragmentos de tumor que, depois de enxertados, mostraram os seguintes resultados:

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos postos no líquido de cultura que não esteve em contacto com o carvão, não se desenvolveu nenhum tumor.

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pelo líquido de cultura filtrado depois que esteve em contacto com o carvão, desenvolveram-se 5 tumores.

Houve, portanto, uma remoção praticamente total da substância antineoplásica. Esta provavelmente ficara retida nas particulas do carvão. Êsse fato foi depois plenamente confirmado em três experiências posteriores (836, 837 e 841 C).

a) Eluição da substância antineoplásica pela acetona: Verificada a propriedade que tem o carvão ativado de adsorver a substância antineoplásica o outro passo era conseguir a sua eluição ou separação das partículas que a retinham. Foi o que procuramos fazer numa primeira tentativa em que empregamos a acetona, do modo seguinte:

EXPERIÊNCIA 831 B: Cêrca de 500 ml. de líquido ativo foram misturados com cêrca de um têrço do seu volume de carvão ativado. Depois da filtração em que se despresou a parte líquida que atravessara o filtro, o carvão foi misturado com cêrca de 100 ml. de

acetona. A acetona foi separada do carvão mediante filtração, evaporada a 40°C. e o resíduo dissolvido em 50 ml. de solução salina isotônica. Com êsse material foram tratados diversos fragmentos de tumor, que pelo enxerto resultaram em outros tantos tumores.

Como nesta experiência a quantidade de carvão fôsse relativamente grande em relação ao volume de acetona empregado e como a acetona usada não teve sua atividade favorecida pela modificação do pH da parte adsorvida, atribuimos o malogro da tentativa a essas duas causas, que foram evitadas numa nova experiência em que êsses detalhes foram tomados em consideração.

EXPERIÊNCIA 831 C: Cêrca de 1000 ml. de um líquido de cultura de 8 dias, depois de filtrados foram reduzidos a 50% do seu volume, por ebulição numa cápsula de porcelana. O concentrado foi bem misturado a cêrca de um décimo de seu volume, de carvão ativado e filtrado, dando uma parte aquosa praticamente incolor. Em seguida o carvão retido sôbre o filtro foi lavado com cêrca de 200 ml. de água distilada contendo 1 gota de solução N/100 de ácido clorídrico. Após essa lavagem o carvão foi tratado com 500 ml. de acetona, que depois de filtrada e evaporada deu líquido xaroposo de côr amarela pardacenta.

Êsse eluido concentrado foi depois tratado com cêrca de 5 volumes de água distilada e usado para tratamento de alguns fragmentos de tumor.

Nos 3 camondongos enxertados com fragmentos do eluido acetônico, preparado nas condições descritas após tratamento pela água ácida, não se desenvolveu nenhum tumor.

Pela experiência referida vê-se que o carvão que reteve a substância antineoplásica cede essa substância à acetona, si previamente o pH do meio adsorvente for abaixado mediante lavagem com solução levemente ácida.

b) Eluição da substância antineoplásica pela água alcalinizada: Tendo verificado que a lavagem acidulada praticamente não remove a substância antineoplásica que depois pode ser separada pela acetona (Experiência 831 C), tentamos verificar o que acontecia quando o carvão contendo a substância estudada era tratado pela água levemente alcalinizada. O método adotado para essa verificação foi o que se segue:

EXPERIÊNCIA 838: Cêrca de 500 ml. de um líquido de cultura bastante ativo foram misturados com cêrca de um décimo do seu volume de carvão ativado e filtrados. A parte retida no filtro

foi lavada com 200 ml. de água distilada contendo 1 gota de solução N/100 de soda. A seguir o carvão foi extraido com 200 ml. de acetona que foi evaporada a 40°C. dando um resíduo que por sua vez foi suspenso em 50 ml. de solução salina isotônica.

Outros 500 ml. do mesmo líquido de cultura foram adsorvidos por um décimo de volume de carvão. O carvão foi tratado primeiramente por 200 ml. de acetona, a qual depois de filtrada e evaporada forneceu um resíduo que foi suspenso em 50 ml. de solução salina isotônica. O mesmo carvão retido no filtro, após extraido pela acetona, foi tratado por cêrca de 200 ml. de água distilada contendo 1 gota de solução N/100 de soda. Após filtração êsse líquido teve a sua alcalinização contrabalançada pela adição equivalente de ácido clorídrico.

Com as duas porções foram tratados separadamente dois lotes de fragmentos de tumor, durante 86 horas, a 4°C.

Os enxertos dêsses fragmentos demonstraram o seguinte:

Nos 5 camondongos enxertados com os fragmentos tratados pelo extrato acetônico feito depois da lavagem do carvão com água levemente alcalinizada, desenvolveram-se

5 tumores.

Nos 5 camondongos enxertados com os fragmentos tratados pelo extrato em água levemente alcalirizada após tentativas de extração do carvão pela acetona não se desenvolveu

nenhum tumor.

Esta experiência mostra dois fatos interessantes: 1.° que, como na experiência 831 B, o tratamento diréto do carvão contendo substância antineoplásica pela acetona é insuficiente para a libertação desta última; 2.° que a simples lavagem dêsse carvão com água levemente alcalinizada é suficiente para remover a substância antineoplásica.

Os resultados dêste ensáio foram plenamente confirmados quando ele foi repetido posteriormente (Experiência 842).

c) Eluição da substância antineoplásica pela água acidificada: Para confirmar a observação da experiência 831 C, que indicava a ineficiência da água acidificada para remover a substância antineoplásica do carvão adsorvido, fizemos o seguinte:

EXPERIÊNCIA 839: Cêrca de 1 000 ml. de líquido de cultura ativo são adsorvidos com cêrca de um décimo do seu volume de carvão. O carvão com a substância neoplásica é separado da parte líquida e depois lavado com 200 ml. de água distilada contendo 1 gota de solu-

ção normal de ácido clorídrico. A água distilada acidificada foi separada do carvão, neutralizada e usada para tratamento de prova. O carvão do filtro é extraido com 200 ml. de acetona. A acetona foi depois evaporada e o resíduo suspenso em 50 ml. de solução salina isotônica e usado para tratamento de 5 fragmentos de tumor.

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos tratados pela água ácida usada na eluição, desenvolveram-se

5 tumores.

Nos 5 camondongos enxertados com os fragmentos tratados pelo extrato acetônico após lavagem com água ácida não se desenvolveu

nenhum tumor.

Êstes resultados confirmam os da experiência 831 C, e demonstram que a água acidificada, ou seja com pH baixo, não remove a substância antineoplásica adsorvida no carvão. O tratamento ácido, todavia, atua sôbre o conjunto carvão-substância antineoplásica, permitindo que esta última seja removida pela acetona.

Para comprovar mais uma vez os resultados obtidos fizemos as seguintes experiências:

EXPERIÊNCIA 882, 500 ml. cultura de 10 dias de *P. notatum* em Czapek-Dox contendo autolisado de levedo de cerveja, são adsorvidos em cêrca de 50 cc de carvão. A mistura é filtrada e o líquido da filtração é desprezado. O carvão é eluido com 100 ml. de solução N/100 de ácido clorídrico. O líquido que serviu para a eluição é neutralizado e reduzido a 10 ml. por ebulição, dando um líquido amarelo xaroposo o qual é diluido em parte igual de água, fornecendo o que chamamos fração I.

O mesmo carvão em seguida é eluido com 100 de solução N/100 de soda. Êste líquido é neutralizado e reduzido por ebulição a um volume de 10 ml. fornecendo também um líquido xaroposo parecido com o precedente. Êste líquido é neutralizado e diluido em volume de água, fornecendo a chamada fração II.

Ainda o carvão tratado pelos dois líquidos anteriores é eluido com 100 ml. de acetona que a seguir é inteiramente evaporada numa estufa a 40°C. dando um resíduo amarelado higroscópico. Êste resíduo é diluido em 10 ml. de solução salina isotônica, fornecendo a fração III.

Com as três frações acima citadas foram tratados 3 lotes de fragmentos de um tumor, durante 96 horas, a 4°C. Êsses fragmentos foram a seguir enxertados em 3 lotes de 5 camondongos, dando os seguintes resultados:

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor tratados pela fração I (eluido em água acidificada)

4 tumores.

Nos 5 camondongos enxertados com os fragmentos de tumor tratados pela fração II (eluido em água alcalina obtido após lavagem do carvão em água acidificada)

nenhum tumor.

Nos 5 camondongos enxertados com os fragmentos de tumor tratados pela fração III (eluido acetônico do carvão lavado com água acidificada e previamente já eluido com água alcalina)

nenhum tumor.

Êstes resultados confirmam as verificações anteriores, mostrando 1.º) que a água com pH ácido não elue o princípio ativo, 2.º) que a água com pH alcalino elue êsse princípio. Mostram ainda que a eluição pela água alcalina é parcial, podendo ser completada pela acetona. Confirmam os da experiência 831 C., e demonstram que a água acidificada, ou seja com pH baixo, não remove a substância antineoplásica adsorvida no carvão. O tratamento ácido todavia, prepara a combinação carvão-substância antineoplásica, permitindo que esta última seja removida. No caso presente a eluição pela água alcalina foi parcial.

Resumindo os fatos principais observados no decorrer dêste estudo, podemos dizer que a substância antineoplásica que se forma no líquido de Czapek-Dox mediante cultura do *P. notatum*, conquanto resista pouco a ação do tempo, resiste bem à ação do calor, podendo ser fervida durante cêrca de 45 minutos sem sofrer alteração apreciavel de sua atividade; é insolúvel no éter acético, no éter sulfúrico e no clorofórmio, e passível de adsorção pelo carvão ativado. Uma vez retida por êsse adsorvente, póde ser recuperada mediante eluição com água ligeiramente alcalina, ou pela acetona, desde que o tratamento pela acetona seja precedido de lavagem do adsorvente com água acidificada. A água acidificada não a elue.

A substância ativa removida pela acetona, depois que êsse solvente é evaporado, apresenta-se com a fórma de um depósito xaroposo de sabor adocicado. O líquido alcalino contendo essa substância, ao ser evaporado também fornece uma substância xaroposa de coloração amarelo-pardacenta. Não foi possível obter sua cristalização. Êste líquido, como o sedimento obtido pela eluição com a acetona, é de forte sabor açucarado e mostra-se muito rico de hidratos de carbono dotados da propriedade de reduzir o reativo de Fehling. A dosagem do azoto revelou a presença de 1,48 mg. de azoto total, em 1 ml. do eluido concentrado.

Não temos ainda elementos para dizer se êsses hidratos de carbono são apenas constituidos pela lactóse que se emprega no líquido de cultura ou por prodútos de transformação dêste açucar. Os dados registrados nêste estudo levam-nos a pensar que a substância antineoplásica procurada não é de natureza proteica, nem gordurosa, sendo provavelmente um corpo hidrocarbonado.

ATTEMPTS TO SEPARATE THE ANTINEOPLASTIC SUBSTANCE FORMED IN CULTURES OF "PENICILLIUM NOTATUM" IN CZAPEK-DOX MEDIUM

Abstract

In order to separate the substance the effect of which was demonstrated, in vitro, against a transplantable tumor of the mouse, a number of experiments are referred.

The main facts concerned consisted in the demonstration of the stability of such a substance when exposed to a temperature of 98°C during 45 minutes, its insolubility in acetic ether and in other fat solvents.

Adsorption of this substance on activated carbon was demonstrated, as well as the possibility of its eluation with alcaline water or acetone.

While further studies are required, there are a number of evidences showing that this substance is a hydrocarbon, possibly derived from lactose.

BIBLIOGRAFIA

1 — Meyer, J. R. — 1945 — Indícios da existência de uma substância antineoplásica formada nos líquidos de cultura do "Penicillium notatum". *Arq. Inst. Biológico*, S. Paulo, 16: 307-314.

AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DO "POLYPORUS CINNABARINUS" DEMONSTRADA "IN VITRO" COM UM TUMOR TRANSPLANTAVEL DO CAMONDONGO

POR

J. R. Meyer e H. Cerruti

Do Instituto Biologico de S. Paulo e da Faculdade de Veterinaria da Universidade de S. Paulo

CORNMAN verificou em 1944 que células normais em culturas de tecidos sobreviviam após contacto com líquido de cultura de *Penicillium notatum*, ao contrário do que acontecia com células de tumores malignos, que perdiam a propriedade de reproduzir o tumor depois dêsse tratamento (3). MARGARET LEWIS (1944) demonstrou que o efeito nocivo nas células neoplásicas, verificado por CORNMAN, não era devido à penicilina formada no líquido de cultura (4). Em 1945 um de nós (MEYER) verificou que fragmentos de um tumor transplantável de camondongo, tratados pelo líquido de cultura de *Penicillium notatum*, perdiam 100% da capacidade de reproduzir o tumor (6). Fragmentos dêsse tumor tratados pela penicilina comercial continuavam 100% ativos na reprodução do tumor, quando inoculados após êsse tratamento. Em 1944 o mesmo autor (5) teve ocasião de demonstrar que um cogumelo do grupo dos basidiomicetos, o *Polyporus cinnabarinus*, era dotado de um princípio bacteriostático até certo ponto comparável ao da penicilina. O mesmo efeito foi verificado por BOSE (1944 e 1946) com outro basidiomiceto do mesmo grupo (1 e 2), Diante do que havia sido observado com o *Penicillium notatum*, que sendo bacteriostático também produzia efeitos antineoplásicos, foi aventada a hipótese de que o basidiomiceto em questão também pudesse produzir, ao lado dos princípios bacteriostáticos, substâncias antineoplásicas como as que apareciam no líquido de cultura do *Penicillium notatum*.

A hipótese foi plenamente confirmada pelas experiências preliminares e resultou num estudo mais sistematizado, que constitue o assunto do presente trabalho.

DEMONSTRAÇÃO DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA

Para esta demonstração foi adotada a técnica seguinte: pedaços de frutificação do *Polyporus cinnabarinus* adulto e recentemente colhida eram colocados em cêrca de 10 volumes de solução isotônica e

fervidos durante 2 a 4 minutos. Em seguida o líquido de côr amarelo-crômo carregada era filtrado e esfriado, ficando pronto para as experiências.

O tumor usado era o adenocarcinoma mamário do camondongo, que vem sendo transplantado há vários anos e que tem a propriedade de se reproduzir por enxêrto subcutâneo praticamente em 100% dos camondongos inoculados (*).

Para cada experiência tomávamos um tumor em pleno desenvolvimento (2 semanas), dividido em 20 fragmentos de cêrca de 3 a 5 milímetros de diâmetro. Déis dêsses fragmentos eram colocados em contacto com o extrato do cogumelo em questão, e outros déis, em solução salina isotônica. Os dois lotes de fragmentos com os respectivos líquidos eram deixados em contacto durante 72 horas na câmara de uma geladeira a temperatura aproximadamente de 4°C. Após êsse período os dois lotes de fragmentos eram enxertados sob a pele do flanco de dois lotes de 10 camondongos, observados periòdicamente e mantidos em condições idênticas. Após a 1.ª semana, o desenvolvimento dos enxêrtos já se mostrava bem nítido, podendo-se notar grande diferença entre os dois lotes. Entretanto, para maior garantia de precisão, os resultados definitivos eram considerados 8 semanas após o enxêrto, quando já não havia possibilidade de qualquer desenvolvimento retardatário.

Os resultados dessas experiências são resumidos no quadro da pagina seguinte.

Como se vê por êsses resultados, não resta dúvida de que nos extratos aquosos do *Polyporus cinnabarinus* é possível demonstrar a existência de uma ação antineoplásica que se manifesta nas experiências, feitas com o tratamento "*in vitro*".

IMPORTÂNCIA DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS TRATADOS PARA VERIFICAÇÃO DE EFEITO ANTINEOPLÁSICO

Na experiência n.º 856 o aparecimento de um tumor entre os camondongos enxertados com material tratado pelo extrato coincidiu com o emprêgo de fragmentos de dimensões maiores que 5 milímetros. Êste fato levou-nos a pensar que o aparecimento do tumor fôsse devido à impossibilidade de penetração do líquido ativo no centro do tumor que por isso não sofreu a ação antineoplásica esperada. Afim de pôr a prova esta possibilidade, realizamos uma experiência que consistiu em tomar 20 fragmentos de tumor que tinham mais de 5 milímetros

(*) Conquanto o tumor usado fôsse primitivamente um adenocarcinoma, típico, no momento atual é um sarcoma fusocelular como sói acontecer nos tumores dêsse tipo, mediante transplantações sucessivas.

Quadro demonstrativo das experiências que evidenciaram a ação antineoplásica do extrato aquoso de *Polyporus cinnabarinus* verificada "in vitro" em um tumor transplantavel de camondongo

EXP.	Nr. de fragmentos de tumor trat. durante 72 horas à 4°C		Nr. de tumores obtidos por enxêrto subcutâneo do material tratado		ATIVIDADE	
	Por solução salina isotônica	Por extrato aquoso de *Polyporus cinnabarinus*	Pela solução salina isotônica	Pelo extrato aquoso de *Polyporus cinnabarinus*	Neoplásica do tumor usado nas experiências (*).	Antineoplásica do extrato aquoso de *Polyporus cinnabarinus* (**).
N.° 820	10		10		100%	
		10		0		100%
N.° 824	10		10		100%	
		10		0		100%
N.° 850	10		10		100%	
		10		0		100%
N.° 856	9		9		100%	
		10		1		90%
N.° 861	10		10		100%	
		10		0		100%
Totais	49		49		100%	
		50		1		98%

(*) A atividade neoplásica do tumor é avaliada pela porcentagem dos tumores que se desenvolveram após o enxêrto do material tratado pela solução salina isotônica.

(**) A atividade antineoplásica do extrato aquoso do *Polyporus cinnabarinus* é avaliada pela porcentagem dos resultados negativos que se observaram com os enxertos do material tratados pelo extrato aquoso a experimentar.

de diâmetro. Déis dêsses fragmentos, ao serem colocados no extrato aquoso, foram perfurados em vários pontos com a ponta de um bisturí, afim de se favorecer a penetração do líquido em seu interior. Os outros 10 fragmentos destinados a servir como testemunhas foram apenas colocados no extrato aquoso sem se fazer a perfuração citada. Enxertamos os fragmentos em dois lotes de 10 camondongos. Resultaram os seguintes tumores (Experiência n.° 857):

10 fragmentos perfurados para favorecer a penetração do extrato aquoso deram origem a 3 tumores.

10 fragmentos não perfurados deram origem a 10 tumores.

Os resultados citados mostram que o êxito das experiências é condicionado pelo tamanho dos fragmentos ou pela possibilidade de contacto completo com o extrato aquoso.

FATORES QUE PREJUDICAM A ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO EXTRATO

Dada a verificação da atividade descrita, nossa curiosidade foi logo levada a indagar quais os fatores principais que pudessem prejudicar o efeito antineoplásico do *Polyporus cinnabarinus*. Com êsse propósito foram estudadas várias condições, que passaremos a mencionar.

a) Ação do tempo

O extrato preparado pela técnica habitual foi dividido em 3 porções, deixadas na geladeira a 4°C. e usadas respectivamente 2, 5 e 37 dias após o preparo. Os fragmentos de tumor ativo, de menos de 5 milímetros de diâmetro, foram postos em contacto com essas três porções, durante 72 horas e inoculados em lotes de 10 camondongos cada um, dando os seguintes resultados (Experiências: 859, 860 e 865):

Extrato preparado ha 2 dias: em 10 camondongos não obtivemos nenhum tumor.

Extrato preparado ha 5 dias: em 10 camondongos obtivemos dois tumores.

Extrato preparado ha 37 dias: em 10 camondongos obtivemos oito tumores.

Êstes dados demonstram que a atividade antineoplásica é pouco estável, desaparecendo gradativamente com o tempo, mesmo quando o extrato é conservado em baixa temperatura.

b) Ação do calor

O extrato recentemente preparado foi dividido em 2 porções: a primeira foi fervida durante 30 minutos e a segunda durante 60 minutos. Depois de resfriadas colocamos em cada uma 10 fragmentos de tumor ativo, de menos de 5 milímetros de diâmetro. Após o contacto de 72 horas, à temperatura de 4°C., os fragmentos foram enxertados em 20 camondongos, dando os seguintes resultados (Experiência 861):

Extrato fervido durante 30 minutos: 10 camondongos não apresentaram nenhum tumor.

Extrato fervido durante 60 minutos: 10 camondongos não apresentaram nenhum tumor.

Isto vem provar que a fervura, embora prolongada, não altera a atividade antineoplásica descrita.

c) Influência de acidêz

O extrato recentemente preparado nas condições normais descritas, apresenta-se ordinariamente com pH variável entre 6 a 6,5. Supondo que êsse fator pudesse modificar a atividade estudada, fizemos uma experiência (experiência n.º 864) que consistiu em tomar o extrato e tratar uma parte dêle por uma solução alcalina e outra parte por uma solução ácida. Para a alcalinização usamos duas gotas de solução centinormal de soda para 10 milílitros de extrato. Para a acidificação empregamos duas gotas de solução centinormal de ácido clorídrico em 10 milílitros de extrato. Os fragmentos de tumor ativo tratados durante 72 horas com os líquidos acima citados e inoculados em 2 lotes de 10 camondongos cada um, resultaram no seguinte:

Fragmentos tratados com extrato alcalinizado: em 10 camondongos observamos o desenvolvimento de 9 tumores.

Fragmentos tratados com extrato acidificado: em 10 camondongos não observamos nenhum tumor.

Pela experiência acima podemos concluir que a alcalinidade prejudica a atividade antineoplásica do extrato de *P. cinnabarinus*.

d) Ação inibidora de proteinas

Tendo sido verificado que a ação antineoplásica tão nitidamente demonstrada *in vitro* se mostrava precária nas experiências *in vivo*, lembramo-nos da possibilidade da existência de ação inibidora, exercida pelas substâncias proteicas encontradas no organismo. Com essa idéia em vista fizemos uma primeira experiência (experiência n.º 868) que consistiu em provar a atividade do extrato depois de posto em contacto com uma parte igual de sôro normal de cavalo, e uma segunda (experiência n.º 874) em que lançamos mão de uma solução aquosa, a 5%, de ovoalbumina cristalizada "Merck", que foi adicionada em parte igual à do extrato.

RESULTADOS DA EXPERIÊNCIA N.º 868

Nos 10 camondongos enxertados com fragmentos de tumor postos em contacto com o extrato e mais parte igual de sôro normal de cavalo obtivemos 8 tumores.

Nos 10 camondongos enxertados com fragmentos de tumor postos em contato com o extrato e mais parte igual de solução isotônica não obtivemos nenhum tumor.

RESULTADOS DA EXPERIÊNCIA N.º 874

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor postos em contacto com o extrato e mais parte igual de solução aquosa a 5% de ovoalbumina cristalizada de "Merck" obtivemos 4 tumores.

Nos 5 camondongos enxertados com fragmentos de tumor postos em contacto com o extrato e mais parte igual da solução isotônica não obtivemos nenhum tumor.

Como se vê, os dois materiais proteicos empregados prejudicam consideràvelmente a ação antineoplásica em apreço, o que parece explicar a precaridade dos resultados do extrato quando aplicado *in vivo*.

O presente trabalho nos pareceu interessante como confirmação de uma idéia geral que nos leva a pensar que cogumélos capazes de produzir substâncias antibióticas bacterianas, também produzem, paralelamente, outras substâncias antibióticas, independentes das primeiras, capazes de exercer antibiose contra as células neoplásicas ou seus agentes causais.

Tendo em vista a inocuidade do extrato aquoso e os achados relatados no presente trabalho, é de interesse a possibilidade do emprêgo da substância antineoplásica do *Polyporus cinnabarinus*. Antes de fazer juizo a êste respeito, torna-se necessário: em primeiro lugar a separação completa ou parcial da substância antineoplásica, em segundo lugar, verificar a possibilidade de sua concentração e o estabelecimento de um método apropriado para a sua conservação.

ANTI-NEOPLASTIC ACTIVITY OF "POLYPORUS CINNABARINUS", DEMONSTRATED "IN VITRO", ON A TRANSPLANTABLE TUMOR OF THE MOUSE

Abstract

This paper refers to an anti-neoplastic action of the adult form of P. cinnabarinus. This property is similar to the anti-neoplastic action found in cultures of Penicillium notatum. Pieces of a transplantable tumor of the mouse which is being mantained in this laboratory for several years, treated by aquous extracts of Polyporus cinnabarinus, during 72 hours, at 4°C., were unable to reproduce the tumor in susceptible mice, while pieces of the same tumor treated under the same temperature during an equal period of time, mantained 100% of their neoplastic activity. The aquous extracts were prepared boiling one part of the adult forms or the fungus with five or six parts of water during 5 to 10 minutes. The activity of this extract was mantained from four to six days at a temperature of 4°C. and after a treatment by heat, at 98°C., during 30 minutes.

Extracts of P. cinnabarinus prepared with alcool or acetone were partially active, while extracts prepared with fat

solvents were entirely inactive. This anti-neoplastic activity is partially or completely lost when the aquous extracts are treated by animal proteins or by alcaline solutions.

The anti-neoplastic action is markedly diminished when the extracts are injected in mice bearing the tumor, perhaps on acount of its impairement caused by animal proteins with which it enters in contact before reaching the tumor.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bose, S. R. — 1944 — A preliminary note on "polyporin", *Current Sci.*, 13: 233-234.

2 — Bose, S. R. — 1946 — Antibiotics in a polyporus (Polystictus sanguineus). *Nature*, 158: 292-296.

3 — Cornman, J. — 1944 — Survival of normal cells in penicillin solutions lethal to malignant cells. *Science*, 99: 247-248.

4 — Lewis, M. R. — 1944 — The faillure of purified penicillin to retard the growth of grafts of sarcoma in mice. *Science*, 101: 314-315.

5 — Meyer, J. R. — 1944 — Ação bacteriostática de um cogumelo macroscópico pertencente à familia das poliporáceas "Polyporus cinnabarinus". *Arq. Inst. Biológico*, S. Paulo, 15: 27-36.

6 — Meyer, J. R. — 1945 — Indícios da existência de uma substância antineoplásica formada nos líquidos de cultura de "Penicillium notatum". *Arq. Inst. Biológico*, S. Paulo, 16: 307-314.

———o———

NOVOS FOCOS DE ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO EM SÃO PAULO, IDENTIFICADOS PELAS PROVAS DE SÔRO-NEUTRALISAÇÃO

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em 1937 estudamos, em um primeiro trabalho, um surto de encefalomielite equina surgido no Estado de S. Paulo, e isolamos de cérebro de cavalo a primeira amostra brasileira de virus (3). Não só pelo conjunto de dados clínicos reunidos no foco, como pela série de provas experimentais, foi seguramente afastada a possibilidade de confusão com outras doenças de quadro clínico semelhante, em linhas gerais, mas não idêntico. Bastava ter conhecimento do trabalho fundamental de MEYER, HARING e HOWITT (12) quando isolaram, em 1931, o primeiro virus americano, e das etapas percorridas pelo problema nos Estados Unidos de 1847 a 1930, para se ver logo e sem dificuldade, em face do surto de Tatuí, que se tratava de foco idêntico aos que assolam desde a primeira descrição de LARGE, em 1847, por ondas periódicas, zonas diversas do Continente (13).

Em 1939, baseados no conhecimento do que revela a literatura do assunto e na observação direta do fóco brasileiro, insistimos na possibilidade e na necessidade de se realizar a caracterização clínica segura dos fócos da doença em nosso meio, mesmo apenas com o concurso dos dados de ordem clínica reunidos em inquéritos bem conduzidos. Há um conjunto de fatores de caracterisação clínica dos fócos (4-6).

Em 1943-1944, em novas publicações (5-6), examinamos resultados de novos estudos do virus brasileiro, e principalmente sua posição imunológica em face dos três tipos de virus conhecidos, pelas provas cruzadas de imunidade tissular e pelas experiências de imunidade humoral. A amostra brasileira foi assim classificada como uma variedade do tipo leste.

Em outras regiões do País, LENNETTE e FOX (11) em Minas Gerais e CUNHA (7) no Nordeste Brasileiro, pelas provas de sôro-proteção, realisadas com sôros de cavalos colhidos em zonas suspeitas, demonstram a presença de anticorpos neutralisantes do virus leste; e CUNHA, conforme comunicação pessoal, isola em seguida, de cerébro de cavalo, a segunda amostra brasileira.

Em sua nota sôbre o assunto, LENNETTE e FOX (11) deixam margem a uma confusão injustificavel entre o trabalho de identificação completa de uma doença, que é constituido, no caso, de descrição clí-

nica de um fóco bem caracterisado, isolamento de um virus, demonstração de suas características muito especiais de patogenicidade, estudo da infecção experimental, eliminação de outras doenças passiveis de confusão, — e o trabalho de determinação de tipo de virus, que é coisa completamente diversa. Além disso, sem levar em conta o conjunto de provas fornecidas quanto ao foco paulista de 1937, provas de ordem clínica e experimental, impressionam-se demasiadamente com o engano de diagnóstico ocorrido na Baía, onde se tratava de raiva, quando escrevem que o único virus identificado no País era um virus rábico!

É necessário assinalar essa confusão improcedente, entre identificação de uma doença bem caracterisada clinicamente e do seu virus, de um lado, e a determinação do tipo de virus, de outro, duas cousas diversas, que podem andar associadas, mas que não o estão obrigatoriamente no caso da encefalomielite equina.

Em carta e em comunicação pessoal, antes da publicação do seu trabalho e a seu pedido, fornecemos a LENNETTE dados complementares ainda não publicados, que não são recordados com a necessária precisão: sôbre o comportamento do nosso virus por inoculações em embrião de pinto, sôbre efeito letal rápido no embrião, sôbre altos títulos infectantes dessas culturas, preparo de vacinas dessas culturas, o que por si só bastaria como documentação indiscutivel do caracter específico do virus; mas fornecemos ainda dados sôbre o estado das provas de imunidade cruzada, pelas quais o virus brasileiro não era oeste nem venezuelano. Toda a documentação experimental fornecida depois, em trabalhos de 1943 a 1944, confirma o acerto e o alicerce de nossas afirmações anteriores. Pelo fato de existirem na literatura duas confusões recentes entre o virus rábico e o virus da encefalomielite esquina, uma na Baía e outra com o virus russo, denominada Moscow 2, não se deve supor que essa confusão ocorra sempre e em todos os laboratórios e em tôdas as condições. Aqui mesmo, em São Paulo, temos tido ocasião, em varias oportunidades, de isolar virus rábico de cérebro de cavalos com diagnóstico clínico de encefalomielite. Recentemente novos casos são referidos pelos autores norte-americanos e é inegavel que em casos isolados a confusão, clìnicamente, pode ocorrer, mas não em surtos epizoóticos que permitem separação segura das duas doenças. No laboratório, por outro lado, a separação dos dois virus constitue, como assinalamos (6), problema elementar de rotina nas nossas condições de trabalho e desde 1937.

Em uma revista geral da literatura das encefalomielites dos equideos examinaremos longamente os enganos de diagnóstico acima referidos. (Arq. Inst. Biologico, vol. 17, pp. 269-330.)

*

* *

Estão assim assinalados e identificados no País cinco fócos de encefalomielite equina: o primeiro em São Paulo, 1937, o segundo em Minas Gerais, 1943 e tres no Nordeste Brasileiro, 1943, em Pernambuco, R. G. do Norte e Ceará. Em outras regiões do Brasil existem suspeitas quanto à presença da doença, mas nada se conhece de definitivo: faltam inqueritos clínicos completos e provas experimentais.

O objetivo do presente trabalho é relatar a identificação de quatro novos fócos da doença em São Paulo, em Chavantes, Cafelândia, Mogiguassú e Araraquara, documentada pelas provas de soro-neutralisação realisadas com sôros de equideos sangrados nos surtos epizoóticos.

Torna-se porém necessária uma articulação estreita da clínica com o laboratório, no sentido de se isolarem novas amostras de virus de outras regiões do País. Adiante voltaremos a assinalar a necessidade de não nos deixarmos conduzir pela predileção exclusiva pelas provas de soro-neutralisação, sem o concurso de dados clínicos, dada a possibilidade de se chegar apenas a um diagnóstico de infecção e não de doença.

*

* *

No curso dêstes últimos anos vêm chegando aos nosso conhecimento, em ocasiões diversas, notícias relativas a novos fócos suspeitos da doença no interior do Estado e em outras regiões do País. Numerosos são os materiais de cérebro, recebidos do interior, que forneceram resultados negativos às tentativas de isolamento de virus por inoculações intracerebrais no camondongo e na cobaia.

São várias as causas que podem explicá-los. Em alguns casos esses resultados negativos provêm de autópsias tardias, ou de inativação do virus no cérebro, ou no líquido conservador, durante o período que decorre do momento da necrópsia à chegada ao laboratório. Em outros casos é possivel admitir, com relativa segurança, que os resultados negativos devem ser atribuidos a enganos ou suspeitas infundadas acerca da encefalomielite específica: em um caso por exemplo, um fator tóxico pôde ser responsabilisado. Além disso, em outros casos a ausência de encefalomielite pôde ser constatada, como no de Campinas, pela ausência de soros positivos em bom número de soros examinados, dez amostras, em um efetivo pequeno, de trinta equideos. Finalmente, em outros fócos suspeitos, foi possivel afastar a encefalomielite de modo seguro, pelo isolamento do virus rábico, pela presença de

sintomas típicos de raiva em cobaias inoculadas, com exitação e agressividade caraterísticas, com período de incubação sensivelmente mais longo, de 8-10-12 dias para o camondongo e para a cobaia, e presença de corpusculos de Negri, nítidos, em abundância, inconfundiveis, em cérebros de animais inoculados.

Em face de reiteradas suspeitas da existência da doença em várias zonas, iniciamos um inquérito no sentido de conhecer a presença de fócos, pelas provas de soro-proteção realisadas com soros de equideos, doentes ou sãos, sangrados nas propriedades onde as suspeitas se assinalavam. O inquérito vai de julho de 1945 a setembro de 1946 e compreende o exame de 87 soros de equideos, em grande maioria equinos, procedentes de 15 locais. Os resultados negativos não têm valor, dado o número reduzido de soros de cada local, isto é, não podem indicar ausência da doença, mas indicariam apenas que a suspeita, no efetivo considerado, não pôde ser confirmada. Vamos pois tomar em consideração apenas os resultados positivos. Eles indicam já certa disseminação da doença pelo interior do Estado e por zonas variadas e distantes umas das outras. O primeiro fóco, o mais extenso, de morbilidade e de mortalidade mais elevadas, que é o de Chavantes, extende-se pelos municípios visinhos; houve aí cerca de 100 casos da doença. O segundo fóco foi localisado em Cafelândia, o terceiro em Mogiguassú, e o quarto em Araraquara.

TÉCNICA DO TRABALHO

À medida que chegavam ao nosso conhecimento suspeitas de surtos novos da doença, eram solicitados materiais de necrópsias, constituidos de fragmentos de cérebro em glicerina fosfatada de pH 7,2, e soros de animais curados, ou normais, sangrados na mesma propriedade.

As provas de soro-neutralisação foram realisadas segundo a técnica de OLITSKY e HARFORD (14), isto é, pela inoculação das misturas virus-soro por via peritoneal no camondongo novo de 14-16 dias de idade, técnica muito mais sensivel do que a cerebral e que nos forneceu, em 1944, excelentes resultados nas experiências de soro-proteção cruzada (5).

O virus usado é a amostra brasileira, classificada como uma variedade do tipo leste. Alguns dias antes de serem realizados os exames dos soros, 6-8 camondongos brancos, adultos, de 30-40 dias, são inoculados por via intracerebral depois de ligeira anestesia pelo éter, com 0, 03 cc de emulsão virulenta de cérebro de camondongo ou cobaia. Três passagens pelo cérebro do camondongo são assim realisadas. Quando típicos, em paralisia e caídos, ao cabo de cerca de 48 horas, os camondongos são sacrificados, os cérebros removidos asepticamente e conservados a + 4°C, em glicerina fosfatada de pH 7,2, durante 1-3 dias, quando não são usados no mesmo dia.

Uma emulsão inicial de cérebro dêsses camondongos a 20% é preparada em água fisiológica e centrifugada ràpidamente a 2.500 r-p.m. durante 10 m. O sobrenadante é removido e diluições sucessivas do virus são realisadas com 0,5 cc da emulsão inicial em presença de 4,5 cc de água fisiológica, variando essas diluições

do virus de 2×10^{-1} e 2×10^{-8} em geral. Em pequenos tubos de hemolise, a cada 0,25 cc de virus se adiciona volume idêntico de soro, de modo a se obterem misturas virus-soro, variando de 10^{-1} e 10^{-8}. As misturas usadas para os soros a examinar eram ordinariamente 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}. Para um soro neutralisante conhecido, obtido de coelho hiperimunisado, as misturas usadas eram 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, e para um soro normal de coelho, ou de cavalo, as diluições do virus eram de 10^{-4} e 10^{-8}. São assim usados um contrôle de soro-neutralisação positiva e um contôle da DLM do virus, em presença de soro normal.

As misturas virus-soro são agitadas duas vezes e conservadas durante cerca de 10 m à temperatura ambiente, sem incubação prévia (5) e logo inoculadas.

As inoculações são realisadas no camondongo suisso albino, de 14-15-16 dias de idade, na dose de 0,1 cc por via peritoneal. Cada diluição é inoculada em 3 camondongos.

Os animais inoculados são examinados várias vezes por dia de modo a surpreenderem-se os primeiros sintomas, os sintomas típicos e a incubação e a evolução dentro dos limites habituais, em cerca de 48 horas. Adoecendo os camondongos em limites fóra do habitual, em geral mais cedo, são considerados como de infecção secundária por contaminantes do soro, e o resultado é considerado prejudicado. Em caso de necessidade, pode-se porém repetir a prova com soro filtrado.

A observação dos lotes inoculados é levado até 10 dias, mas em geral no terceiro dia, ou no quarto, os inoculados com virus e soro normal em diluições mais altas já se definiram . As gaiolas são mantidas em ambiente telado e o exame dos animais doentes e a remoção dos mortos devem ser cercados de cuidados para se evitarem infecções humanas, por via nasal, atravez de poeira de serragem contaminante.

A avaliação dos resultados e a determinação do índice de neutralisação foram realizadas de acôrdo com o método de REED e MUENCH (1-16), representando a diferença entre o título de soro em exame e o título do virus em presença de soro normal.

Como se verifica pelas tabelas que acompanham o trabalho, os soros em exame foram provados apenas em presença de três diluições de virus, 10^{-4}, 10^{-3} e 10^{-2}, representando aproximadamente um número de DLM que quando neutralisadas pelo soro, indicaria sempre um resultado positivo nítido. Era necessário organisar uma rotina para exames seriados com economia de animais, dada a dificuldade de se obterem sempre grandes lotes de camondongos novos e exatamente do mesmo número de dias. Os autores norte-americanos assinalam a mesma dificuldade.

Nessas condições, em um trabalho de rotina, diluições mais altas do virus não foram ensaiadas; um soro que não neutralisasse pelo menos regularmente e de modo nítido, a diluição mais alta do virus, era considerado negativo. Teoricamente, é possivel que um soro assim negativo possa em realidade neutralisar um número menor de doses letais; mas essa possibilidade é aqui despresada. Em todo caso, alguns ensaios isolados visando verificar essa possibilidade, deram resultados negativos e um soro que deixa de neutralisar o virus a 1 p. 10.000 fornece o mesmo resultado a 1 p. 100.000.

A técnica peritoneal aplicada mesmo a soros de infecção natural, como no presente caso, pela sua alta sensibilidade, permite, aliás, um índice de neutralisação alto, alcançando 10.000-100.000 DLM e mesmo números maiores, e não

necessita pois que se examinem os soros em presença de multiplos baixos de DLM, como no caso da técnica cerebral.

Do mesmo modo, nos exames seriados aqui relatados, não haveria interesse em verificar si um soro de cavalo neutralisando a diluição 10^{-2} de virus, neutralisaria igualmente a diluição a 1 p. 10. Em ambos os casos, neutralisando por exemplo 316.000 ou 3.160.000 DLM peritoneais, o resultado é sempre positivo. Nessas condições, dosagens dos soros positivos em geral não foram tentadas. Apenas nos soros de Cafelandia uma dosagem foi tentada e não forneceu resultado muito melhores.

As três diluições usadas na rotina dêstes ensaios representam, pois, no caso do virus brasileiro, diluições ideais para revelar logo grande número de soros positivos em zonas enzoóticas, em exames em série, fornecendo logo e a um único exame um resultado nitidamente positivo, ou mesmo fortemente positivo. Resultados irregulares não foram tomados como positivos.

*
* *

1 — O foco de Chavantes — Depois de havermos examinado cerca de 40 sóros de várias localidades, que forneceram resultados negativos, em princípio de abril do corrente ano chegaram informes de suspeitas de encefalomielite no município de Chavantes e nos municípios visinhos, na fronteira do Estado do Paraná. Várias propriedades eram atingidas; casos mortais e casos de cura se registravam; a doença só atingia os equideos; o quadro clínico se revelava com os clássicos sintomas da encefalomielite, com distúrbios propriamente encefálicos, perturbações da visão e da locomoção, a evolução em média, em 3-6 dias. O número exato de casos não pôde ser precisado, mas pôde ser calculado em 100. Apenas um dos casos mortais foi necropsiado e forneceu, pelas inoculações, resultados negativos.

Solicitamos sôros de equideos para provas de sorô-proteção e o Dr. A. PEDROSO, da Secção de Assistência Veterinária do Instituto, se encarregou das sangrias realisadas em várias propriedades. Estas alcançaram 15 animais, provenientes de cinco propriedades, casos curados ou animais normais. Dos 15 sôros examinados, 5 são de animais normais e 10 de doentes.

Os resultados dêsses 15 sôros estão reunidos nas tabelas 1 e 2, em duas séries de provas, dada a dificuldade de se obterem grandes lotes de camondongos novos. Os sôros que não neutralizaram pelo menos a diluição mais alta de virus, como os de n.º 1-10-12-13, foram considerados negativos, como já assinalamos. Os sôros 5 e 6 foram ainda considerados negativos ante a irregularidade de resultados que forneceram. Como se verifica pelas tabelas 1 e 2, em 15 sôros de Chavantes, um tem o resultado prejudicado pela morte acidental dos

camondongos, e dos 14 restantes, 8 são positivos n.os 2-3-4-8-9-11-15 e 16, neutralizando de 176.000 a mais de 316.000 DLM peritoneais.

2 — Foco de Cafelandia — Em uma fazenda do mucípio, com 150 equinos e 70 muares, houve em fevereiro-março do corrente ano um surto suspeito, com cinco casos fatais, de evolução rápida, em cerca de dois dias: sonolência, depressão profunda, distúrbios da visão, ataxia locomotora, periodos de excitação. Foram exanados 5 sôros e 4 revelaram-se positivos. Os resultados vão reunidos na tabela 3, onde aparece um primeiro ensaio, e um segundo teste que é uma tentativa de dosagem de alguns sôros positivos. Os sôros positivos aqui neutralizam 100.000 e 316.000 DLM peritoneais, n.os 1-2-4 e 5.

3 — Foco de Mogiguassú — Em maio-junho novas suspeitas aparecem em uma fazenda deste município, com morte de 9 animais, equinos e muares: distúrbios da visão e do equilíbrio, fases de excitação, são assinalados, assim como presença de casos curados, com sequelas, paralisias dos músculos cervicais. Foram sangrados seis equideos: o primeiro, doente antigo, cujo exame ficou prejudicado; o segundo, aparentemente são, cujo sôro é negativo; o terceiro, do mesmo modo são, cujo sôro neutraliza 314.000 DLM peritoneais de virus; o quarto, doente recente, e restabelecido, cujo sôro é positivo, neutralizando 378.000 DLM peritoneais do virus brasileiro; o quinto e o sexto sôros, de animais normais, são negativos. Os resultados estão na tabela 4.

4 — Foco de Araraquara — Ha cerca de três anos vêm-se verificando casos suspeitos da doença em uma fazenda deste município. Em julho do corrente ano morreram cinco equideos em um mês: distúrbios do equilíbrio, da marcha e da visão são assinalados, mas a evolução parece muito rápida. Uma necrópsia tardia foi realisada mas as inoculações foram negativas. Foram colhidos 5 sôros de equideos aparentemente são, quatro dos quais positivos, como se verifica pela tabela 5, neutralisando de 553.000 a 5.530.000 DLM.

*
* *

Em resumo, o resultado é o seguinte:

1 — Chavantes:

Número de sôros	examinados	15
	positivos	8
	suspeitos	3
	negativos	4

2 — Cafelândia:
Número de sôros examinados 5
positivos 4
negativo 1

3 — Mogiguassú:
Número de sôros examinados 6
positivos 2
negativos 3
prejudicado 1

4 — Araraquara:
Número de sôros examinados 5
positivos 4

Total geral de sôros examinados 87
(em 15 municípios)
Total de sôros examinados nos 4 fócos 31
Total de sôros positivos 18

DISCUSSÃO

Parece necessário chamar a atenção para o valor relativo que podem apresentar as provas de sôro-neutralização como método de diagnóstico da doença, quando apresentadas como resultado isolado e único, e acentuar do mesmo modo a importância que é necessário dar, em nosso meio, aos inquéritos clínicos completos dos fócos e ao isolamento de novas amostras brasileiras para estudo imunológico completo.

É certo que o fato de se encontrarem anticorpos protetores do tipo leste em várias zonas suspeitas, com casos clinicos em serie, indica uma distribuição já mais extensa da infecção e da doença em nosso meio, diagnosticada por uma técnica que é específica de tipo de virus. No presente caso houve indicações clínicas nem sempre completas quanto á presença da doença. Mas é necessário considerar a possibilidade da presença da infecção em uma determinada região, sem que no momento em que surge uma mortalidade extranha entre equideos, seja o virus específico o responsavel pela morbidade e pela mortalidade. O resultado positivo das provas de sôro-neutralização viria, em tal caso, encobrir a etiologia e dificultar-lhe o achado.

Esta hipótese encontra apoio nos dados da literatura e na frequência com que anticorpos são encontrados nas zonas endêmicas, onde a doença ocorre, ou onde pode haver apenas infecção.

As provas de soro-neutralização têm sido largamente utilisadas em estudos epidemiológicos com o objetivo de determinar a distribuição e a frequência da infecção no cavalo, no homem, nas aves e em numerosas especies domésticas e selvagens. E resultados surpreendentes têm sido reunidos, que mostram presença da infecção atravez

TABELA 1

Provas de sôro-neutralização em sôros de equideos do município de Chavantes

Sôros	Diluições de virus usadas									Resultados
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	DLM 50% neutralizadas
1		3/3	3/3	3/3						N
2		0/3	0/3	0/3						P > 316.000
3		2/3	0/3	0/3						P 189.000
4		0/3	0/3	0/3						P > 316.000
5		3/3	2/3	1/3						D
6		3/3	0/3	2/3						I
Contrôles:										
Sôro neutr. de coelho	3/3	1/3	0/3							
Sôro normal de coelho					3/3	3/3	1/3	1/3	0/3	DLM : 10^{-7}

N.º de animais mortos / N.º de animais inoculados
N — negativo
P — positivo
D — duvidoso
I — irregular

TABELA 2

Provas de sôro-neutralização em sôros de equideos provenientes de Chavantes. 2.ª série

Sôros	Diluições do virus brasileiro usadas								Resultados	DLM 50% neutralizadas
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		
7		3/3	2/3	0/3					D	
8		0/3	0/3	0/3					P	> 176.000 DLM
9		0/3	0/3	0/3					P	> 176.000 DLM
10		3/3	3/3	3/3					N	
11		0/3	0/3	0/3					P	> 176.000 DLM
12		3/3	3/3	3/3					N	
13		3/3	3/3	3/3					N	
15		0/3	0/3	0/3					P	> 176.000 DLM
16		0/3	0/3	0/3					P	> 176.000 DLM
Contrôles:										
Sôro neutr. de coelho	2/3	0/3	0/3							
Sôro normal				3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	DLM : $10^{-6,7}$	

TABELA 3

Provas de sôro-neutralização em sôros de equideos de Cafelândia

Sôros	Diluições do virus usadas									Resultados
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	DLM 50% neutralizadas
1			0/3	1/3	0/3					P 68.100
2			0/3	1/3	0/3					P 68.100
3			3/3	3/3	3/3					N
4			0/3	0/3	0/3					P > 100.000
5			0/3	0/3	0/3					P > 100.000
S. neutr.			0/3	0/3	0/3					
S. normal				3/3	3/3	3/3	1/3	2/3	0/3	DLM do virus: $10^{-7,5}$
Repetição com alguns sôros positivos										
1	3/3	0/3	0/3							P 100.000 DLM
2	3/3	0/3	0/3							P 100.000 DLM
4	1/3	2/3	0/3							P 316.000 DLM
S. neutr.	1/3	0/3	0/3							
S. normal				3/3	3/3	3/3	0/3	0/3		DLM : $10^{-6,5}$

TABELA 4

Pesquisa de anticorpos neutralisantes em sôros de Mogiguassú

Sôros	Diluições do virus usadas								Resultados	DLM 50% neutralizadas
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		
1									Prejudicado	
2		3/3	3/3	3/3					N	
3		1/3	0/3	0/3					P	314.000
4		0/3	1/3	0/3					P	378.000
5		3/3	3/3	3/3					N	
6		3/3	3/3	3/3					N	
Contrôles										
Sôro-neut. de coelho	1/3	0/3	0/3							
Sôro normal de coelho				3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	DLM do virus: $10^{-7,2}$	

N.º 2 — Aparentemente são.
N.º 3 — Idem.
N.º 4 — Doente recente; curado.
N.º 5 — São.
N.º 6 — Idem.

TABELA 5

Pesquisa de anticorpos neutralisantes em sôros de equideos de Araraquara

Sôros	Diluições do virus brasileiro usadas								Resultados	DLM 50% neutralizadas
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		
1		0/3	1/3	0/3					P	> 3.760.000
2		3/3	0/3	0/3					P	553.000
3		1/3	0/3	0/3					P	> 3.140.000
4		0/3	0/3	0/3					P	> 5.530.000
5		3/3	3/3	3/3					N	< 5.530
Contrôles										
Sôro-neut. de coelho	0/3	0/3	0/3							> 55.300.000
Sôro normal de coelho				3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	DLM do virus : $10^{-8,2}$	

Observações: — Nesta série de cinco sôros, apenas o último, n.º 5, é considerado negativo, porque não neutralisa o menor número de DLM peritoneais testados, isto é, 5.530 DLM.

Os outros quatro sôros ensaiados neutralisam, como se vê pela tabela, de 553.000 a mais de 5.530.000 DLM.

O sôro neutralisante de coelho hiperimunisado neutralisa aí, funcionando como contrôle, mais de 55.300.000 DLM peritoneais paar o camondongo novo. A DLM de virus, em presença de um sôro normal é aqui $10^{-8,2}$

Nesta série experimental em que o título do virus é sensivelmente mais alto do que nas outras das tabelas anteriores, aparece com maior evidência a alta sensibilidade da técnica peritoneal que revela, não em sôros hiperimunes, mas em sôros de infecção natural em equideos, não só maior número de sôros positivos do que a técnica cerebral, como índices de neutralisação elevados, isto é, até mais de cinco milhões de DLM neutralisadas.

de um número consideravel de animais nos quais a doença ainda não é conhecida.

TEN BROECK, HURST e TRAUB, estudando a epidemiologia nos estados da costa leste dos Estados Unidos, consideram a possibilidade de existir a infecção disseminada entre os equideos da região, dos quais apenas alguns desenvolvem sintomas clínicos. A pesquisa de anticorpos em sôros de equinos da área epizoótica revela, em 53 sôros examinados, 9 resultados positivos (17%,) para o tipo leste. Resultados idênticos são assinalados por GILTNER e SHAHAN (8). OLITSKY e HARFORD (14) assinalam, do mesmo modo, presença de anticorpos em sôros de cavalos de áreas epizoóticas que nenhum indício de infecção anterior revelaram.

Exemplos idênticos e mesmo mais nítidos, porque a reconstrução dos antecedentes clínicos é mais precisa e mais segura, de presença da infecção independentemente de doença clínica caracterizada, podem ser revelados no homem e em inquéritos de vários autores. O assunto é examinado desde 1939 por OLITSKY e MORGAN, que assinalam anticorpos neutralisantes em um indivíduo de laboratório sem nenhum antecedente relativo á encefalomielite. BUSS e HOWITT (2), do mesmo modo, chegam a resultados positivos em casos de provavel infecção por contato com doentes, produzindo forma frusta ou inaparente. HAMMON e HOWITT, em 75 sôros humanos examinados, provenientes de áreas não endêmicas, encontram anticorpos protetores em cinco sôros de pessoas que não apresentam história clínica de encefalomielite. A interpretação dêsses achados é discutida por SCHLESINGER, MORGAN e OLITSKY (17).

No cavalo a presença de anticorpos se verifica em áres endêmicas, mas pode verificar-se igualmente em áres não endêmicas, embora em geral com maior frequência no primeiro caso. Assim, para lembrar apenas um exemplo, HOWITT e VAN HERICK (10), em área enzoótica, examinam 45 sôros com 43 resultados positivos, ou 95%; em área não enzoótica, 24 exames fornecem dez positivos, ou 41,6%.

Essa frequência com que se encontram anticorpos específicos mostra a necessidade de consagrar importância ao estudo clínico dos focos suspeitos da doença. Os inquéritos clínicos completos são pois necessários e podem permitir, como temos acentuado desde 1939, o diagnóstico seguro das epizootias, afastando outras doenças. O isolamento de novas amostras é igualmente necessário, principalmente nos estados onde ainda nada se conhece de definitivo, para determinação de tipo de virus de cada região.

RESUMO

Um inquérito é realisado no interior do Estado de São Paulo, pelas provas de sôro-neutralização segundo a técnica de OLITSKY e HARFOD, no sentido de verificar a presença da encefalomielite infecciosa. O inquérito compreende 87 sôros de equideos provenientes de 15 localidades diversas. Quatro novos fócos da doença são assim assinalados no interior do Estado. Em 31 sôros examinados, de quatro fócos, 18 são positivos, neutralizando de 68.000 a 5.530.000 DLM peritoneais do virus brasileiro, tipo leste, para o camondongo novo.

Podem-se assinalar no País, dêsse modo, nove fócos da encefalomielite equina: o primeiro em São Paulo, o segundo em Minas Gerais, o terceiro, o quarto e o quinto no Nordeste Brasileiro, e agora quatro novos fócos em São Paulo. Em todos o tipo leste é que está em causa.

*

* *

Deixamos aqui registrados nossos agradecimentos ao dr. ANDERSON DE ANDRADE, que a nosso pedido teve a gentilesa da avaliar os resultados pelo método de REED e MUENCH; e aos drs. A. PEDROSO, J. M. XAVIER, O. FREITAS e E. MARTINELLI, que se encarregaram da colheita dos sôros e nos forneceram alguns dados acerca dos fócos positivos.

FOUR NEW FOCI OF EQUINE ENCEPHALOMYELITIS IN SÃO PAULO IDENTIFIED BY TESTS OF SERUM-NEUTRALISATION

Abstract

An enquiry is being made in the Interior of the State of São Paulo, by means of tests of serum-neutralisation by the peritonial route in mice order to reveal new foci of equine encephalomyelitis. The enquiry comprises the examination of 87 samples of serum of horses ande mules, from 15 differente localities.

Four new foci of the disease were thus found in the State of São Paulo: of 31 samples of serum examined, resulting from these four foci, 18 samples of serum were positive, neutralising from 68.000 to 5.530.000 M.L.D. of virus, Brasilian Strain, which is of the Eastern type.

There are thus, in this country, nine foci of the disease: the first in São Paulo, 1937, the second in Minas Geraes, the third, fourth and fifth in the North East of Brasil, and now four new foci in São Paulo. All these foci are of the eastern type.

BIBLIOGRAFIA

1 — Boyd, W. C. — 1943 — Fundamentals of Immunology, 1 vol., 446 pp. cf. p. 397. Interscience Publishers, Inc., New York.

2 — Buss, W. C. and B. Howitt — 1941 — Human equine encephalomyelitis in Kern County, Ca., *Amer. J. Publ. Health*, 31: 935-944.

3 — Carneiro, V. — 1937 — A encefalomielite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 8: 115-134.

4 — Carneiro, V. — 1939 — Equine encephalomyelitis in Brazil. Proc. VI th. Pacific Science Congress, 5: 251-258. *Bol. Soc. Min. Med. Vet.*, 1942 — 2: 13-24.

5 — Carneiro, V. — 1944 — Estudos de imunidade cruzada entre o virus brasileiro da encefalomielite infecciosa do cavalo e os virus americanos — pelas provas de sôro-neutralisação. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 15: 209-238.

6 — Carneiro, V. e R. Cunha — 1943 — Estudos sôbre a encefalomielite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 14: 157-194.

7 — Cunha, R. — 1943 — Verificação de anticorpos para o virus êste da encefalomielite equina em sôro de cavalos no Nordeste Brasileiro. *Rev. Bras. Biol.*, 3: 425-430.

8 — Giltner, L. T. and M. S. Shahan — 1936 — The present status of infectious equine encephalomyelitis in the United States. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 41: 363-374.

9 — Hammon, W. M. and B. Howitt — 1942 — Epidemiological aspects of encephalitis in the Yakima Valley, Wash., *Amer. J. of Hyg.*, 35: 163-185.

10 — Howitt, B. and Van Herick — 1942 — Relationship of the St. Louis and the western equine encephalic viruses to fowl and mammals in California. *J. Infect. Dis.*, 71: 179.

11 — Lennette, E. and J. Fox — 1943 — Anticorpos neutralisantes para a amostra leste do virus da encefalomielite equina no Brasil. *Mem. Inst.* Oswaldo Cruz, 38: 85-92.

12 — Meyer, K. F., C. Haring and B. Howitt — 1931 — The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquim Valley, 1930. *Science*, 74: 227-228.

13 — Meyer, K. F., C. Haring and B. Howitt — 1931 — New knowledge of the neurotropic virus infections of the horse. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 32: 376-389.

14 — Olitsky, P. K. and C. G. Harford — 1938 — Intraperitoneal and intracerebral routes in serum protection tests with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 68: 173-189.

15 — Olitsky, P. K. and I. Morgan — 1939 — Protective antibodies against encephalomyelitis virus in the serum of laboratory workers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 41: 212-215.

16 — Reed, L. J. and H. Muench — 1938 — A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493.

17 — Schlesinger, R. W., I. Morgan and P. K. Olitsky — 1942 — Significance of neutralising antibody in experimental equine encephalomyelitis. *J. Amer. Med. Ass.*, 119: 618-620.

18 — Ten Broeck, C., E. W. Hurst and E. Traub — 1935 — Epidemiology of eq. encephalomyelitis in the eastern U.S. *J. Exp. Med.*, 62: 677-685.

Vol. 17 — Art. 12 Dezembro de 1946

SOBRE A AÇÃO DA PENICILINA NA ESPIROQUETOSE DE PINTOS E AVES ADULTAS

POR

P. Nobrega e R. C. Bueno

Do Instituto Biológico de S. Paulo

INTRODUÇÃO

Em trabalho preliminar, publicado em 1945 (4), NOBREGA e BUENO demonstraram que a injeção intramuscular de penicilina em aves doentes de espiroquetose determina o desaparecimento do espiroqueta da circulação 24 horas após a administração da primeira dose do medicamento. Em trabalho posterior, BUENO e NOBREGA verificaram a possibilidade de se curar a espiroquetose com uma unica injeção intramuscular de 20.000 unidades de penicilina em suspensão cero-oleosa.

Nos trabalhos mencionados empregamos doses elevadas de penicilina e realizamos o tratamento sempre no terceiro dia de infecção. Havia por isso necessidade de se proceder ao estudo dos seguintes aspectos do problema, que constituem objeto do presente trabalho:

a) Determinação da dose mínima curativa, do medicamento;

b) Ação da penicilina comparativamente na espiroquetose de pintos e aves adultas; e

c) Efeito do tratamento nos diferentes dias de infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Para determinação da dose minima curativa, do medicamento, empregamos 50 galinhas adultas, de 1,750 a 2,100 Kg., que foram inoculadas intramuscularmente com sangue infetado com espiroqueta. No terceiro dia de infecção, cada grupo de 10 animais é tratado respectivamente com 2.500, 5.000, 10.000 e 20.000 unidades de penicilina sódica por quilo de peso; o 5.º grupo é conservado como testemunha.

Na experiencia com pintos, empregamos sempre animais de 1 a 5 dias de idade, procedendo-se ao tratamento no mesmo dia, 24 e 48 horas respectivamente após a inoculação intramuscular dos pintos com espiroqueta.

A verificação da cura ou infecção é feita pela pesquisa do espiroqueta em campo escuro; o exame do sangue é feito no dia do tratamento e repetido nos dias seguintes até a morte dos animais ou desaparecimento do espiroqueta da circulação, nas testemunhas.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados obtidos no tratamento da espiroquetose com diferentes doses de penicilina:

TABELA 1

Tratamento da espiroquetose pela penicilina
Dose: 2.500 a 20.000 unidades por quilo de pêso em 5 injeções intramusculares, com intervalo de 3 horas

Lote	Aves 1750 a 2100 gr	Dose Penicilina Unidades Oxford	Data Infecção	Data Tratamento	% de animais com espiroqueta no sangue		% de Mortalidade
					25.11	26.11	
1	10	2.500	22/11/46	25/11/46	100	80	70
2	10	5.000	22/11/46	25/11/46	100	0	0
3	10	10.000	22/11/46	25/11/46	100	0	0
4	10	20.000	22/11/46	25/11/46	100	0	0
5	10	Testemunha	22/11/46		100	100	100

A tabela acima confirma os resultados anteriores por nós obtidos (4, 1), quanto à eficiencia da penicilina no tratamento da espiroquetose e ao mesmo tempo mostra que a dose minima curativa é aproximadamente de 5.000 unidades Oxford por quilo de peso. A inoculação de 2.500 unidades faz desaparecer o espiroqueta da circulação de 2 entre 10 animais, mas a mortalidade atinge ainda um coeficiente muito elevado em comparação com a dose de 5.000 unidades, que determina cura completa de todos animais tratados.

A tabela 2 mostra a ação da penicilina no tratamento da espiroquetose de pintos infetados no 3.º dia de vida e tratados simultaneamente 24 e 48 horas após a infecção.

TABELA 2

Tratamento da espiroquetose de pintos e aves adultas com penicilina administrada em 5 doses com intervalo de 3 horas

Lote	Pintos 50 gr	Galinhas 1500 gr	Dose de penicilina por quilo de pêso	Data da Infecção	Data do Tratamento	% de animais com espiroquetose no sangue Data						% de mortalidade
						3/6	4/6	5/6	6/6	7/6	8/6	
1	10		20.000	3/6/46	3/6/46	0	0	10	70	100	100	0
2	10		20.000	3/6/46	4/6/46	0	0	0	0	70	90	10
3	10		20.000	3/6/46	5/6/46	0	0	100	40	60	60	30
4	10		Testemunhas	3/6/46		0	0	100	100	100	100	30
5		10	5.000	3/6/46	5/6/46	0	0	100	0	0	0	0
6		10	Testemunhas	3/6/46		0	0	100	100	90	†	100

Os resultados acima demonstram claramente a diversidade de ação da penicilina na espiroquetose de pintos e galinhas. Ao passo que em aves adultas a administração de 5.000 unidades por quilo de peso determina o desaparecimento completo dos espiroquetas da circulação e cura todos os animais, em pintos a inoculação de uma dose quatro vezes maior, isto é, de 20.000 unidades por quilo de peso, determina os seguintes resultados:

a) aumento do periodo de incubação;

b) desaparecimento completo dos espiroquetas apenas em 10 a 40% dos animais tratados; e

c) aparecimento de recidivas em 20 a 30% dos casos.

Para estudar o efeito do tratamento nos diferentes dias de infecção, empregamos pintos de 35 dias de idade, com peso médio de 250 gr, que foram infetados com espiroqueta e tratados com 10.000 unidades Oxford de penicilina, divididas em 5 injeções de 2.000 unidades, aplicadas intramuscularmente com intervalo de 3 horas.

A tabela 3 mostra o resultado da experiencia.

TABELA 3

Tratamento da espiroquetose pela penicilina
Dose: 10.000 unidades Oxford em 5 injeções intramusculares de 2.000 unidades

Lote	Pintos 250 gr	Data da Infecção	Data do Tratamento	% de animais com espiroquetose no sangue Data						
				13/5	14/5	15/5	16/5	17/5	18/5	19/5
1	10	13/5/46	13/5/46	0	0	0	0	0	0	0
2	10	13/5/46	14/5/46	0	0	0	60	20	10	0
3	10	13/5/46	15/5/46	0	0	100	80	40	20	0
4	10	13/5/46	16/5/46	0	0	100	100	10	0	0
5	10	13/5/46	17/5/46	0	0	100	100	100	0	0
6	10	13/5/46	-	0	0	100	100	100	90	0

Os resultados acima mostram que a penicilina exerce nitida ação bacteriostática sobre o espiroqueta aviário, que desaparece gradualmente da circulação, em consequencia da ação combinada da penicilina e dos anticorpos formados pelo organismo, os quais determinam o desaparecimento dos espiroquetas nos animais testemunhas entre o 5.º e 6.º dias de infecção.

A ação coadjuvante dos anticorpos é muito nitida, por exemplo no grupo infetado em 13.5.46 e tratado em 17.5.46; observa-se aqui o desaparecimento completo dos espiroquetas no dia seguinte ao do tratamento, quando a ação dos anticorpos já começa a fazer sentir-se no grupo testemunha.

IMUNIDADE NOS ANIMAIS TRATADOS PELA PENICILINA

Todos os animais tratados e curados definitivamente pela penicilina mostraram-se resistentes a uma inoculação de espiroqueta feita uma semana depois. Resultado identico se observou com o grupo de animais da Tabela 3, cujo tratamento, feito no mesmo dia de infecção, impediu completamente o aparecimento da espiroquetose na circulação.

DISCUSSÃO

Os resultados das experiencias aqui referidas mostram que a espiroquetose em aves adultas pode ser completamente curada pela penicilina, na dose de 5.000 unidades Oxford por quilo de peso administradas em 5 injeções intramusculares, com intervalo de 3 horas.

Já na experiencia feita para o tratamento da espiroquetose em pintos, os resultados são completamente diferentes, pois a dose de 20.000 unidades de penicilina por quilo de peso determina o desaparecimento completo do espiroqueta somente em um pequeno numero de animais tratados. Alem disso, ao passo que nas aves adultas a cura é completa, em pintos observam-se frequentemente casos de recidiva.

Esta diferença de resultados se deve á falta de produção de anticorpos pelos animais muito novos; com efeito, os trabalhos de Kroó (2, 3) demonstram que os pintos muito novos não conseguem reagir à vacinação contra a espiroquetose e apresentam uma doença de evolução muito longa, ao contrário dos adultos, nos quais a duração da moléstia é limitada pela reação do organismo.

As experiencias aqui feitas demonstram o duplo mecanismo de ação da penicilina sobre o espiroqueta aviário: de um lado a ação bacteriostática e espiroqueticida do medicamento, de outro a ação dos anticorpos elaborados pelo organismo. Ambos são fatores importantes, mas as experiencias em pintos demonstram que a ação exclusiva da penicilina (bacteriostática e espiroqueticida) não consegue eliminar o espiroqueta da circulação, senão em um numero insignificante de animais. A cura completa de todos os casos somente se verifica nas experiencias com aves adultas, onde os anticorpos formados progressivamente durante a evolução da doença contribuem para a eliminação permanente dos espiroquetas sensibilisados pela penicilina.

ON THE TREATMENT OF CHICKS AND FOWL SPIROCHETOSIS WITH PENICILLIN

Abstract

In doses of 5.000 Oxford units per kilogram weight, penicillin has an absolute curative action against spirochetosis of adult fowl.

Injection of 20.000 units of penicillin per kilogram weigh in very young chicks, however, does not cure spirochetosis completely.

The spirochetae persist in the majority of the animals treated and in some cases recurrence may be observed. Generally the incubation period is increased.

This difference in the results obtained in the treatment of spirochetosis in adult fowl and young chicks is due to the fact that no antibodies are formed in very young animals. This fact was demonstrated by Kroó (2, 3).

In the treatment of spirochetosis by penicillin 2 factors intervene: on the one hand the bacteriostatic and spirocheticide action of the drug, and on the other hand the action of the antibodies produced by the organism.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bueno, R. C. e P. Nobrega — 1946 — Sôbre o tratamento da espiroquetose aviária pela penicilina (*In press*).

2 — Kroó, H. — 1933 — Über Infektionsverlauf und Immunität bei neugeborenen und erwachsenen Tieren, *Klin. Woch.*, 40: 1573-1574.

3 — Kroó, H. — 1935 — Studien über Immunität und Chemoterapie bei neugeborenen und erwachsenen Tieren, *Zeit. f. Immunforsch.*, 84: 1-13.

4 — Nobrega, P. e R. C. Bueno — 1945 — A ação da penicilina na espiroquetose aviária. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 16: 15-17.

———o———

Vol. 17 — Art. 13

Dezembro de 1946

A VERRUGOSE DA MANGUEIRA

POR

A. A. Bitancourt e Anna E. Jenkins

Do Instituto Biológico de S. Paulo
e do Departamento da Agricultura dos Estados Unidos

Com as estampas 12-14

INTRODUÇÃO

Em 1942, de regresso de uma viagem aos Estados Unidos, e de passagem por Cuba, o primeiro autor, durante uma visita à Estação Experimental Agricola de Santiago de las Vegas, na companhia do Dr. STEPHEN BRUNER, verificou um forte ataque de verrugose nas fôlhas de mangueira (*Mangifera indica* L.) de um viveiro da referida Estação. As lesões novas achavam-se cobertas por abundantes frutificações de um fungo e este material, secado naturalmente à sombra, servio algumas semanas mais tarde, em São Paulo, para o isolamento do fungo em culturas monoconidicas (1).

No decorrer de 1942, 1943 e 1944 o segundo autor pôde identificar a mesma verrugose em especimens provenientes da Florida, enviados por diversos correspondentes, principalmente o Dr. G. D. RUEHLE. Já em 1937, durante uma visita à Florida, ela colhera, em companhia de N. E. STEVENS, juntamente com outros especimens, algumas fôlhas de mangueira com verrugose.

O estudo subsequente destes materiais provou, como era de esperar pelos caracteres das lesões, que o fungo causador pertence à familia das Elsinoaceas e é uma espécie ainda não descrita, deste grupo.

Doenças aparentemente causadas por fungos do mesmo grupo tinham sido anteriormente observadas em mangueira pelo primeiro autor. Em Julho de 1938 êle isolou, por cultura de tecido, de lesões em fôlhas de mangueira, um fungo com o crescimento lento e a estrutura de talo compacta que caracterisam os fungos da familia das Elsinoaceas. As lesões apresentadas pelas fôlhas, que motivaram a colheita do especimen, alguns dias antes, na localidade de Domingos Villela, Estado de São Paulo (IB 2951), não apresentavam frutifica-

(1) Este material recebeu o número IB 4416 no herbario da Secção de Fitopátologia do Instituto Biológico de São Paulo. Os números citados no presente trabalho, precedidos das iniciais IB, referem-se aos especimens desse herbario. As iniciais USM referem-se a especimens das coleções micológicas do "Bureau of Plant Industry, Soils and Agricultural Engineering", do Ministerio da Agricultura dos Estados Unidos.

ções visiveis quando do exame então feito, mas tinham alguns dos caracteres da antracnose, um dos dois tipos de doenças causadas por este grupo de fungos (JENKINS, 1933).

Baseado neste isolamento, o especimen, como representante deste grupo de doenças, foi exibido, juntamente com outros, durante as sessões da Primeira Reunião Sul-Americana de Botânica, no Rio de Janeiro, em Outubro de 1938 (JENKINS e BITANCOURT, 1944) e o hospedeiro incluido numa lista publicada no mesmo ano (BITANCOURT e JENKINS, 1938).

Quando de uma viagem aos Estados Unidos em 1939, de passagem por Porto Rico, no trajeto de ida, e pela localidade de Summit, na zona do Canal de Panamá, na volta, o primeiro autor encontrou lesões do tipo da verrugose em fôlhas de árvores adultas de mangueira (IB 3503, 3506 e 3463). Estas lesões, como as dos especimens do Brasil, eram desprovidas de frutificações.

O presente trabalho relata os estudos que foram efetuados com os diversos especimens que acabam de ser mencionados. A principio julgou-se que todos êles, apezar de suas diferenças, representavam exemplares de uma mesma doença. Como tais foram citados numa comunicação preliminar (BITANCOURT e JENKINS, 1943). Um estudo mais demorado, entretanto, mostrou que o fungo presente nos especimens de Cuba e de Florida não se achava nas lesões dos especimens brasileiros. Diversas outras diferenças foram observadas, que serão salientadas no presente trabalho. Á luz destes estudos somente os especimens de Cuba, Florida, Porto Rico e Zona do Canal são considerados como representantes da doença que aqui designamos por verrugose da mangueira e o presente trabalho trata mais especialmente desta doença e dos especimens correspondentes. Em apêndice, sob o nome provisorio de "doença brasileira" será descrita a que foi observada nos especimens colhidos em São Paulo e no Amazonas e que, de diversos pontos de vista, corresponde melhor às antracnoses do que às verrugoses (JENKINS, 1933).

A VERRUGOSE DA MANGUEIRA

SINTOMATOLOGIA

A descrição que segue está baseada no especimen tipo IB 4416.

F ô l h a s n o v a s: Nas fôlhas muito novas (Est. 12, *A* e *D*) as manchas são pequenas, hipofilas ou mais raramente epifilas, salvo as manchas maiores, que são visiveis em ambas as faces da fôlha,

arredondadas ou ligeiramente angulares, medindo 0,1 a 1,5 mm de diametro, ou então dispostas ao longo das nervuras, na face inferior da fôlha e alongadas, ovaladas ou naviculares, medindo até 3 mm de comprimento. Quando originadas na face inferior das fôlhas, as manchas maiores, anfígenas, são, na face superior, razas, ou levemente deprimidas, lisas ou finamente enrugadas na periferia, um tanto lusidias, de cor marron (*light seal brown*) (2) até quase preta, raramente com o centro do mesmo tom um pouco mais claro; na face inferior as mesmas manchas são ligeiramente salientes nas bordas e deprimidas no centro, densamente cobertas pelas frutificações da forma imperfeita, que lhes emprestam a sua cor parda clara (*olive buff*), salvo na periferia saliente onde não há frutificações e a cor é marron escuro (*Hay's brown*) até preto. Um número muito pequeno de manchas, geralmente situadas nas beiras ou na ponta das fôlhas, apresenta na face superior o aspecto que acaba de ser descrito para a face inferior da maioria das manchas e vice-versa, e são provavelmente causadas por infecção da página superior das fôlhas. Exatamente os mesmos caracteres, com abundantes frutificações na página superior, foram observados em fôlhas inoculadas experimentalmente em estufa, em São Paulo (IB 4615), com culturas de conidias da forma imperfeita do especimen tipo, de Cuba (Est. 13, *C*).

Nas fôlhas novas a doença causa um endurecimento das fôlhas que se tornam quebradiças e têm o crescimento paralisado, caindo com facilidade, pelo que a doença contribue para uma defoliação acentuada.

Fôlhas intermediarias: Em fôlhas mais desenvolvidas mas não completamente maduras, (Est. 12, *E* a *H*) das mesmas plantas, as manchas são numerosas, geralmente visiveis de um lado só das fôlhas ou com um ligeiro empalidecimento dos tecidos da face oposta e são quase tão abundantes na face superior quanto na inferior, muitas delas dispostas ao longo das nervuras secundarias ou formando duas filas irregulares uma de cada lado da nervura principal; outras vezes dispostas ao longo de finas cicatrizes que resultam de lesões mecânicas das fôlhas. Na face inferior das fôlhas, as manchas dispostas ao longo das nervuras secundarias são em regra distribuidas na beira inferior delas, como si proviessem de esporos suspensos em gotas d'agua que permaneceram penduradas na saliência formada por

(2) As cores são indicadas aproximadamente em portuguez. A indicação precisa em inglez, é tirada de: RIDGWAY, R. Color standards and color nomenclature. 43 pp. Washington. D. C. 1912.

tais nervuras; em um caso notou-se a disposição das manchas em círculo ou arco de círculo, conforme se observa com *Elsinoë fawcetti* BIT. e JENK. agente da verrugose dos *Citrus*, sem dúvida como resultado da distribuição dos esporos na periferia de uma gota d'agua ou de orvalho.

As manchas das fôlhas intermediarias, como nas fôlhas mais novas, são pequenas, raramente alcançando mais de 1,5 mm de diametro e usualmente de menos de 1 mm; mas frequentemente são abundantes, a ponto de se tornarem coalescentes e cobrirem irregularmente areas relativamente extensas. Neste caso há, às vezes, uma necrose das manchas e dos tecidos intermediarios que transformam as lesões em uma mancha extensa e muito irregular, uniformemente preta. Essa necrose parece devida à invasão dos tecidos afetados por micro-organismos secundarios como *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ., ou então a uma alteração dos tecidos entre as manchas, indiretamente provocada pela abundância das lesões de verrugose.

Individualmente, as manchas são salientes na periferia, que pode ser de cor amarela muito clara (*light buff*), tornando-se logo escura na direção do centro, passando para marron escuro (*light seal brown*, até preto), com o centro quase preto. Pelo esvasiamento progressivo das celulas superficiais do tecido das manchas, estas tomam um tom acinzentado superposto às tonalidades que acabam de ser descritas, acentuando-se este caracter á medida que as fôlhas envelhecem. As frutificações da forma imperfeita são completamente ausentes neste estagio das lesões, por terem caído aos poucos.

Nas manchas da face inferior a região periférica amarela clara pode tornar-se mais extensa, aumentando as dimensões das lesões por uma faixa periférica muito irregular, de tecidos um tanto salientes, de aparência bolhosa.

Nas lesões mais velhas a parte hiperplástica dos tecidos do hospedeiro pode separar-se dos tecidos subjacentes, sãos ou apenas ligeiramente alterados, formando uma fissura periférica que permite destacar facilmente a lesão por meio de uma agulha.

A presença abundante de lesões na face superior das fôlhas mais desenvolvidas, ao passo que tais lesões são muito mais raras nas fôlhas mais novas, sugere a ocorrência de uma infecção secundaria dessa face das fôlhas mais desenvolvidas, por conidias produzidas na face inferior das fôlhas mais novas.

Fôlhas completamente desenvolvidas: Nas fôlhas completamente desenvolvidas (Est. 12, *I* e *J*), dos ramos inferiores das mesmas plantas, as manchas apresentam-se com caracteres diferentes: ao lado de numerosas manchinhas salientes, arredondadas, de cor marron clara (*cinnamon buff*), geralmente mais escuras, até preto, no centro, e de aspecto de cera, há manchas maiores, de contornos bem delimitados embora às vezes irregulares, na face superior, menos bem definidos na face inferior. As manchas são ligeiramente salientes porem de superficie plana, com estreita zona periférica de cor marron mais ou menos clara (*sorghum brown* a *light seal brown*) e toda a parte central de cor branca suja, devido ao esvasiamento completo das células de diversas camadas superficiais dos tecidos hiperplásticos da mancha. Esta parte central tem o aspecto de estearina e parece se desintegrar com relativa facilidade, descobrindo-se então, em parte, os tecidos internos, mais escuros, das camadas subjacentes, o que empresta à mancha uma coloração irregularmente acinzentada. Há todas as transições entre as manchinhas de aspecto ceroso e as grandes manchas de cor branca acinzentada, sendo algumas destas últimas bem maiores do que qualquer das manchas das fôlhas mais novas da mesma planta. Este fato pode ser a consequência da coalescência de muitas manchas pequenas, ou talvez resulte do desenvolvimento muito mais rápido destas fôlhas durante a fase de suscetibilidade, do que o das fôlhas novas do mesmo especimen. Tais diferenças de velocidade de desenvolvimento observam-se normalmente entre as primeiras e as últimas fôlhas de uma mesma brotação e podem explicar o tamanho diferente das lesões nos dois tipos de fôlhas. Nas fôlhas velhas do especimen as manchas chegam a medir cerca de 5 mm de diametro, mas a maioria não alcança mais de 1 a 1,5 mm. Na superficie dessas manchas distinguem-se, com lupa de forte aumento, pequenos corpos escuros que são os ascomas da forma perfeita ou frutificações de fungos de invasão secundaria (Est. 12, *K*).

Outros especimens: Nas fôlhas inoculadas com cultura isolada do primeiro especimen de Cuba, nas estufas da Secção de Fitopatologia em São Paulo (Est. 13, *C*), desenvolveram-se em poucos dias pequenas manchas idênticas às manchas das fôlhas novas de Cuba, com produção abundante de frutificações da forma imperfeita na face superior. Como em Cuba, as fôlhas tornaram-se quebradiças e muitas delas cairam antes de alcançar completo desenvolvimento (IB 4615).

No especimen IB 4533, colhido das mesmas plantas por S. BRUNER, em Outubro do mesmo ano, as fôlhas são na maioria completamente desenvolvidas e apresentam os caracteres descritos acima para fôlhas nesse estado. Numerosos picnidios de *Phyllosticta* sp. encontram-se nas manchas maiores. Em uma fôlha pouco desenvolvida, as manchas, na face inferior, estão caracteristicamente dispostas ao longo das nervuras secundarias onde coalescem em lesões continuas, com aparência verrugosa, irregulares e de coloração marron escura (*light seal brown*).

Os especimens de Florida apresentam nas fôlhas sintomas praticamente idênticos aos de Cuba (Est. 12, *O* e *P*) e por isto consideramos a verrugose da mangueira neste Estado norte-americano como a mesma doença verificada em Cuba. Em todos êles as manchas ainda estão cobertas de frutificações da forma imperfeita nas fôlhas intermediarias dos especimens IB 4530 (USM 74401), IB 4706 (USM 74565) e IB 4710 (USM 74549) e mais especialmente nas fôlhas muito novas do primeiro. De modo geral, as manchas nesses especimens apresentam os caracteres descritos para os tipos correspondentes de fôlhas de Cuba; a depressão da parte central das manchas, tanto na face superior como na inferior, é notavelmente acentuada nas fôlhas intermediarias do especimen IB 4530. Este material compreende também galhos que apresentam lesões circulares ou elitticas, ou irregulares, de cerca de 1 mm por 0,3 mm, às vezes confluentes em lesões mais alongadas até 2 mm, cinzentas, salientes, de bordas marron, a parte central escura. Os especimens IB 4529 (USM 74402 e 74403) e 4523 (USM 74400) são de fôlhas maduras, o primeiro com manchinhas muito escuras, tipicamente crateriformes na face superior, onde os tecidos estão fortemente desagregados e fissurados, o que resulta em numerosas perfurações da fôlha. Outra fôlha do mesmo especimen apresenta lesões muito semelhantes às que serão descritas para a doença do Brasil. O segundo especimen tem manchinhas pequenas do limbo, parecidas com as das fôlhas intermediarias de Cuba, porém com lesões da nervura principal e do peciolo alongadas até 6 mm de comprimento, fortemente corticosas, salientes, com fissuras transversais.

G. D. RUEHLE que ultimamente vem fazendo observações seguidas da doença na Florida faz os seguintes comentarios (3):

(3) Carta de 29 de Outubro de 1942.

"We have considerable scab on the mangos in our own nursery, although it may be difficult to find specimens with an abundance of spores at this time of the year. Last spring when we were trying to push young trees along with nitrogen so that they would attain sufficient size for top-working, the stimulation to growth brought on an epidemic of scab infection. Although we sprayed several times with copper fungicides to check its development, it has continued to cause trouble throughout the summer. Most of these trees were topworked during the summer months. The new growth appearing on the scions of the varieties we are propagating appears to be free of the trouble and the foliage of older trees in our variety block likewise has remained free of scab infection".

Em carta posterior (4), RUEHLE acrescenta mais as seguintes informações:

"Scab on mango foliage may be quite serious on seedlings in the nursery, as we found out this past summer. It causes defoliation and appreciably reduces the growth of the young trees."

Dos dois especimens colhidos em grandes árvores de Mayaguez, Porto Rico, em 1939, um (IB 3506) apresenta os caracteres das fôlhas intermediarias do material de Cuba, com manchas pequenas, arredondadas, principalmente na face inferior das fôlhas, onde são também numerosas pequenas manchas alongadas da nervura principal; o outro (IB 3503) tem manchas com o aspecto descrito para as fôlhas completamente desenvolvidas de Cuba, ou seja, na face superior, manchas com o centro branco sujo, porém com os tecidos superficiais mais desagregados, deprimidos, formando uma cratera escura, frequentemente com fissuras radiais que atravessam o limbo da fôlha, havendo até perda completa dos tecidos da parte central, resultando numa mancha perfurada.

O material da zona do Canal de Panamá (IB 3463) tem o aspecto das fôlhas intermediarias de Cuba, com manchinhas mais abundantes na face superior e muito fendilhadas. Alguns conidióforos ainda podem distinguir-se em poucas manchas da zona do Canal, mas desapareceram completamente dos especimens de Porto Rico.

Hastes, inflorescências e frutas: RUEHLE constatou lesões de verrugose nas hastes, inflorescencias (Est. 12, *Q*) e frutas (Est. 12, *R* e Est. 13, *A* e *B*) de mangueiras da Florida e as descreveu da seguinte maneira (RUEHLE, 1944):

(4) Carta de Novembro de 1942.

"Grayish irregular blotches are found on the bark of stems. On young fruits infections are grayish to grayish brown with dark irregular margins. As the fruit enlarges the spot enlarges also and the centers may become covered with cracked and fissured corky tissue".

Em Cuba somente observamos a doença em plantas de viveiros. Sem dúvida ela se manifesta também nas frutas, como na Florida.

ANATOMIA PATOLOGICA

Numa secção transversal de fôlha muito nova do especimen tipo, de Cuba, na região de uma lesão da face inferior da fôlha, são encontrados os seguintes tecidos, a partir da região externa da superficie da lesão: 1.º As frutificações, conidióforos e esporos, da forma imperfeita do fungo parasita; 2.º o pseudoparênquima constituido por algumas camadas de elementos celulares pequenos, de cor amarela clara, que constitue a base dessas frutificações; 3.º uma ou duas camadas de células do hospedeiro completamente cheias de uma goma de ferida amarela escura, com os espaços intercelulares cheios de hifas do fungo parasita; 4.º varias camadas de células achatadas no sentido perpendicular à superficie da lesão, com a luz completamente obliterada e paredes celulares amarelas claras. O colapso dessas células do parênquima folhar é que determina a formação da depressão central das lesões; 5.º um periderma cicatricial, constituido por células grandes, de 15 a 20 μ de diametro, dispostas em filas paralelas compostas de 3 a 6 células, com as paredes anticlinas tipicamente abaúladas, com convexidade virada para o lado da região invadida pelo fungo. As paredes celulares desta região são hialinas na parte profunda, junto da camada geradora cicatricial que formou o periderma, mas tornam-se amarelas e em seguida marron escuro, na região próxima do tecido mais escuro numa secção transversal de uma lesão, distinguindo-se como uma linha curva que, principiando na epiderme inferior, incurva-se para dentro do parenquima folhar, tornando-se paralela as epidermes na parte central da lesão, para, incurvando-se novamente, alcançar finalmente a epiderme inferior, do outro lado da lesão. O periderma constitue portanto como que uma concha que limita os tecidos invadidos pelo fungo dos tecidos ainda sãos da fôlha; 6.º uma camada geradora cicatricial, ou cambio de ferida, constituida por células achatadas, de paredes hialinas extremamente finas e constituida, no máximo, por uma a duas camadas de células; 7.º o parênquima não alterado, incompletamente diferenciado, da fôlha nova.

A camada geradora e o periderma de ferida são portanto formados na periferia da lesão a custa das células epidérmicas inferiores, e na parte media e profunda, das células do parênquima folhar. Em alguns casos, entretanto, a lesão se extende até a epiderme superior que então participa, com algumas células, da formação da camada geradora e do periderma da parte central da lesão.

Esta estrutura anatômica das lesões de verrugose da mangueira apresenta analogias com a verrugose dos citrus, mas nesta última a formação peridermal é extremamente espessa, chegando a constituir a maior parte dos tecidos da "verruga" (CUNNINGHAM, 1938). Na mangueira, como vimos, o periderma acha-se reduzido a poucas camadas de células e não chega a constituir a metade de todos os tecidos da lesão, que acabam de ser enumerados, não havendo portanto formação de uma verdadeira "verruga". A verrugose da mangueira constitue portanto uma transição entre as verrugoses típicas como a dos *Citrus*, e as antracnoses de outros hospedeiros das Elsinoaceas. Nestas últimas o periderma cicatrical também é reduzido. Como nas verrugoses, entretanto, a doença da mangueira ataca fôlhas muito novas e por suas lesões em tecidos ainda em crescimento ativo determina deformações das fôlhas que caracterisam mais as verrugoses do que as antracnoses, pelo que esta doença deve sem dúvida ser incluida entre as primeiras.

O FUNGO

As frutificações do fungo causador da verrugose da mangueira, visiveis nas lesões muito novas de fôlhas em via de desenvolvimento, são constituidas por conidióforos e conidias e pertencem portanto a uma forma imperfeita.

No especimen tipo elas cobrem densamente a superficie das lesões formando um revestimento continuo, aveludado, de coloração parda clara (*olive buff*), que se estende até a periferia da mancha, salvo quanto a uma estreita zona marginal, saliente e escura, desprovida de frutificações.

Estas frutificações (Est. 12, *L*) estão assentadas num estroma pseudoparenquimatoso, extremamente reduzido, parecendo mesmo, em alguns casos, que os conidióforos se formam diretamente nas células superficiais, profundamente alteradas e cheias de goma amarela de ferida, da camada superficial da lesão, pois as hifas intercelulares, de que se destacam os conidióforos, são dificilmente visiveis. Quando

presente o estroma, raramente tem mais de 2 ou 3 camadas de células, que são irregulares, porém mais ou menos isodiamêtricas, aproximadamente de 5 μ de diametro e paredes relativamente finas, amarelas muito claras. Na superficie do estroma, ou entre as células estromáticas, há muitas vezes aglomerados de corpúsculos arredondados ou ligeiramente ovalados, hialinos e muito refringentes, de 0,3 a 0,5 μ de diametro, que têm sido designados, na descrição de outras espécies, sob o nome de microconidias.

Das células estromáticas superficiais ou entre elas quando originados de células mais profundas do estroma, elevam-se os conidióforos, que são isolados ou em feixes, levemente sinuosos, mas nunca francamente varicosos, munidos de um septo no terço ou no quarto inferior, mais raramente de outro na parte superior, geralmente com a célula basal mais ou menos dilatada na sua metade inferior onde o diametro pode alcançar 7 μ, cilindricos na parte restante e na célula ou células superiores, de 2,5 a 3,5 μ de diametro. Quando há um septo na extremidade superior do conidióforo, a célula terminal por ele delimitada apresenta frequentemente uma ligeira dilatação da base, o que lhe empresta uma conformação piriforme. O ápice é apenas ligeiramente atenuado e obtuso, apresentando uma cicatriz de inserção de conidia. Muitos conidióforos somente apresentam uma dessas cicatrizes apicais e mais raramente duas, mas outros ostentam, além destas, varias outras laterais, até 4 ou 5. Nestes casos a parede acima da cicatriz é levemente incurvada para dentro, o que produz uma ligeira geniculação no lugar correspondente, e de certo contribue para que a conidia se mantenha em posição mais ou menos erecta enquanto permanece presa ao conidióforo. Os conidióforos, incluindo a célula basal mais ou menos dilatada, medem de 12 a 35 μ de comprimento e têm paredes aproximadamente de 0,5 μ de espessura e coloração parda clara, bem mais clara na extremidade, mais espessas e mais escuras que as paredes das células do pseudoparênquima basal.

As conidias destacam-se com extrema facilidade de seus conidióforos, onde nunca aparecem presas nas montagens microscópicas, em liquido de Aman por exemplo, salvo quando muitas novas. Algumas são continuas, alongadas ou às vezes ligeiramente piriformes, munidas somente de uma cicatriz de inserção na base, e medem de 6 a 15 μ de comprimento por 2 a 3 μ de largura. Trata-se sem dúvida de conidias terminais. A maioria das conidias, entretanto, são cilindricas, atenuadas nas duas extremidades, ou então alongadamente

ovaladas, continuas ou mais raramente munidas de um septo transversal, com uma cicatriz de inserção em cada extremidade, às vezes com duas cicatrizes, lado a lado numa mesma extremidade, sendo uma delas mais saliente que a outra, formando um curto corno. Estas conidias medem 12 a 24 μ de comprimento por 3 a 4 μ de largura e são, sem dúvida, conidias intermediarias de cadeias mais ou menos longas, ocasionalmente bifurcadas. As paredes das conidias têm a mesma espessura que as dos conidióforos, mas são mais claras, especialmente as das conidias menores, das extremidades.

Nas lesões dos galhos do especimen USM 74401, de Florida, o fungo é visto desenvolvendo-se na forma de hifas entre as células epidérmicas e a cuticula. Os conidióforos medem de 9 a 49 μ de comprimento e têm na base uma dilatação de cerca de 5 μ de diametro, a qual, a cerca de 13 μ da base rapidamente se atenua para 3 μ de diametro. No mesmo especimen as lesões das fôlhas são cobertas das frutificações pardas (*buff*) cujos conidióforos, originados de um estroma feito de elementos celulares de paredes espessas, acham-se reunidos em feixes de cerca de 25 μ de diametro, e têm de 21 a 31 μ de comprimento por 3 μ de diametro. Eles sustentam espóros alongados, de 10-24 × 3-4 μ. As fôlhas apresentam frutificações nas duas faces.

Nas frutas as frutificações da forma imperfeita foram constatadas por RUEHLE (1944) que diz "*Spores of the fungus are produced on the fruit until it reaches maturity. During moist periods the surface of the fruit scabs are covered with a velvety, grayish brown covering of spores...*"

Pelos seus caracteres a forma imperfeita do fungo da verrugose da mangueira pertence, na classificação artificial de P. A. SACCARDO, á ordem dos Hifomicetos e familia das Dematiaceas. Seus caracteres, entretanto, emquadram-no perfeitamente no gênero *Sphaceloma*, de acordo com sua revisão pelos autores (JENKINS e BITANCOURT, 1941) e nele deve ser incluido junto com *Sphaceloma fawcetti*, com o qual apresenta numerosas semelhanças. Até que as relações genéticas entre esta forma imperfeita e a forma perfeita a ser descrita a seguir sejam definitivamente demonstradas, é conveniente designar o fungo que acaba de ser descrito, por um binomio próprio, correspondente à seguinte descrição técnica:

Sphaceloma mangiferae (5) — *Maculis, parvis, vulgo hypophyllis, orbicularibus vel sub-angularibus, 0,1-1,5 mm latis, interdum coalescentibus, vel*

(5) A tradução latina desta diagnose e da forma perfeita foi feita por D. BENTO PICKEL a quem os autores consignam aqui seus agradecimentos.

elongatis et nervisequis, usque 3 mm longis, planis vel leviter in medio depressis, margine elevata brunnea vel nigrescente cinctis, primo velutinis, propter fructificationes, brunneolis, dein glabris (tunc jam sine conidiophoris), medio obscuris vel etiam cinereis (propter infiltrationem aëris) et denique fissuratis atque perforatis. Conidiophoris, e pseudo-parenchymate luteolo exiguo vel absente erumpentibus, erectis et leviter sinuosis, 12-35 µ longis, 2,5-3,5 µ latis, basi dilatata (usque 7 crassa) septatis, apice attenuato et magis hyalino (raro etiam septato) et areolis terminalibus atque lateralibus notatis. Conidiis elongatis, brunneolis, 6-29 × 2-4 µ, continuis vel 1-septatis, catenulatis, basi 1-2 areolatis, apice minime vel solum 1-areolatis.

Sôbre fôlhas, hastes, inflorescências e frutas, causando uma verrugose da mangueira (*Mangifera indica* L.), em Cuba, na Florida, Estados Unidos e provavelmente também na zona do Canal de Panamá e em Porto Rico.

Especimens examinados:

Estación Experimental, Santiago de las Vegas, Cuba, 23 de Julho de 1942, A. A. BITANCOURT 927 (tipo) (IB 4416, USM 74405).

Estación Experimental, Santiago de las Vegas, Cuba, Outubro de 1942. S. C. BRUNER (IB 4533, USM 90250).

Government laboratory, Orlando, Florida, Estados Unidos, 13 de Fevereiro de 1937. H. S. STEVENS e A. E. JENKINS (IB 4523, USM 70400).

Sub-tropical Experiment Station, Homestead, Florida, Estados Unidos, 9 de Novembro de 1942. G. D. RUEHLE (IB 4529, USM 74402).

Sub-tropical Experiment Station, Homestead, Florida, Estados Unidos, 9 de Novembro de 1942. G. D. RUEHLE (IB 4530, USM 74401).

Sub-tropical Experiment Station, Homestead, Florida, Estados Unidos, 4 de Outubro de 1943. G. D. RUEHLE (IB 4706, USM 74565).

Homestead, Florida, Estados Unidos. Agosto de 1943. G. D. RUEHLE (IB 4710, USM 74549).

Mango nurseries, Homestead, Florida, Estados Unidos, 4 de Abril de 1944. G. D. RUEHLE (USM 74667).

Estufas da Secção de Fitopatologia, Instituto Biológico, São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil, 24 de Maio de 1943. A. A. BITANCOURT 976 (inoculações experimentais) (IB 4615).

College of Agriculture, Mayaguez, Porto Rico. Julho de 1939, A. A. BITANCOURT 759 (IB 3503, USM 74482).

Estação Experimental, Mayaguez, Porto Rico. Julho de 1939. A. A. BITANCOURT 762 (IB 3506, USM 74480).

Summit, Canal Zone, América Central. 3 de Novembro de 1939. A. A. BITANCOURT 826 (IB 3463, USM 74483).

FORMA PERFEITA

As frutificações da forma perfeita são encontradas nas lesões maiores da face superior das fôlhas maduras do especimen tipo: nenhuma foi vista na face inferior das mesmas fôlhas. Na superficie das manchas brancas, secas, vêm-se, com uma lupa de forte aumento, pontos arredondados ou ovalados, pretos, que são os ascomas (Est. 12, *K*). Em secções transversais (Est. 12, *N*) verifica-se que eles se desenvolvem dentro da epiderme, da qual se distinguem ainda os restos da parede superior, cobrindo os ascomas. A base dos ascomas está assentada no parenquima em paliçada do hospedeiro cujas células, não deformadas, são entretanto divididas por varias paredes transversais e formam portanto um começo de periderma cicatricial. Estas células estão completamente repletas de goma de ferida parda escura. Estes caracteres anatómicos não correspondem exatamente aos das lesões em fôlhas novas, onde, como vimos, há alterações muito mais profundas dos tecidos, o que talvez se explique pelo fato das lesões das fôlhas maduras do especimen se terem formado em outra estação do ano que não a das fôlhas novas.

Os ascomas são pulvinados, de superficie plana e medem de 80 a 160 μ de diâmetro por 30 a 48 μ de espessura. Seu conteudo é pseudoparenquimático, hialino, feito de elementos celulares irregulares, mais ou menos isodiamétricos, salvo nos lugares onde são comprimidos entre os ascos, onde tomam uma forma alongada. O epitecio é nitidamente definido pela cor parda escura que contrasta com o pseudoparenquima hialino, sem transição, e pela forma achatada dos seus elementos celulares que constituem uma ou duas camadas apenas, aproximadamente de 3 μ de espessura. Os ascos são irregularmente distribuidos no seio do pseudoparenquima, onde formam uma a duas camadas. São globosos e medem de 10 a 15 μ de diâmetro, com parede externa fina e parede interna espessa, principalmente na parte superior onde se distingue, às vezes, uma foveola. No interior dos ascos há 1 a 8 ascosporos hialinos (Est. 12, *M*) geralmente munidos de 3 septos transversais e constritos na região dos septos, principal-

mente no septo mediano, às vezes com um septo longitudinal na célula mediana superior. As duas células superiores são mais curtas e grossas que as 2 células inferiores. Os ascosporos medem 10 a 13 por 4 a 6 μ. Como na forma imperfeita, há numerosas microconidias na superficie e no interior dos ascomas.

Elsinoë mangiferae n. sp. — Ascomatibus pulvinatis, planis, intra-epidermicalibus, 80-160 μ latis et 30-48 μ crassis, e nucleo hyalino pseudoparenchymatoso formatis, epithecio 3 μ crasso tectis, quod ex 1-2 stratis (e cellulis brunneolis compressis formatis) constat. Ascis globosis, irregulariter dispersis, duplo pariete (externo tenui, interno crasso) vestitis, 10-15 μ longis, 1-8 sporis. Ascosporis hyalinis, 10-13 × 4-6 μ, transversaliter 3-septatis, medio septo constrictis et interdum etiam cellula sub-apicali longitudinaliter septata, cellulis superioribus crassioribus et brevioribus.

Presente nas lesões velhas de verrugose da mangueira, causada por *Sphaceloma mangiferae* e provavelmente a forma perfeita deste fungo.

Especimen examinado: Estación Experimental, Santiago de las Vegas, Cuba, 23 de Julho de 1942. A. A. BITANCOURT 927 (tipo) (IB 4416, USM 74405).

A forma perfeita não foi encontrada nos especimens provenientes da Florida.

DOENÇA BRASILEIRA

Conforme foi dito acima, o primeiro reconhecimento de uma doença causada por fungo da familia das Elsinoaceas em mangueira foi feito em fôlhas (IB 2951) (6) de uma árvore adulta em um pequeno pomar de Domingos Villela, Estado de São Paulo.

Comquanto as manchas observadas apresentassem alguns dos caracteres das doenças desse grupo, e mais especialmente da antracnose, a falta de frutificações nas manchas fez que a identificação se baseasse exclusivamente no isolamento por cultura de tecido de um fungo com os caracteres culturais do grupo (cultura 298D).

Salvo quanto a numerosas manchinhas inconspicuas, mal definidas, de cor parda (*ochraceous tawny*), de menos de de ½ milimetro, de diametro, distribuidas principalmente na face inferior de algumas das fôlhas do especimen, as manchas, na sua maioria, são distribuidas dos dois lados da nervura principal e têm um contorno irregular, bem delimitado (Est. 14, *A*). Elas são epifilas, porém visiveis, quando relativamente grandes, na face inferior, na forma de uma mancha

(6) IB 2951 (USM 74481) Domingos Villela, Estado de São Paulo, Brasil, 29 de Junho de 1940. A. A. BITANCOURT 685.

escura de tecidos necrosados, de contorno menos bem definidos e dimensões menores do que a area correspondente na face superior (Est. 14, *B*). As manchas, isoladamente, têm menos de 5 mm de diametro, mas coalescem quase sempre em uma extensa zona, formando às vezes uma faixa longitudinal continua ao longo do centro da fôlha, na metade inferior desta última, alcançando até 6 mm de largura de cada lado da nervura central. As manchas, que são muito pouco salientes e de superficie plana, têm coloração marron escura (*Hay's brown* a *dusky drab*) mas, por esvasiamento das células superficiais, tomam em quase toda a sua superficie uma cor branca suja ou acinzentada. Nenhuma frutificação de forma imperfeita é vista nessas manchas. Elas são frequentemente cobertas pelo talo branco ou ligeiramente esverdeado, de um líquen que forma uma carapaça ou revestimento com aspecto de cal, de contorno lobado e facilmente removivel com a ponta de uma agulha, o que descobre a mancha escura subjacente. Este líquen apresenta muitas vezes numerosas frutificações ou picnidios formando pontos pretos em sua superficie.

As lesões são portanto bem diferentes das descritas para a doença de Cuba. Nos peciolos das mesmas fôlhas, entretanto, podem-se observar pequenas manchas ligeiramente salientes, redondas, de cerca de 1 mm de diametro, que apresentam alguma semelhança com as manchas das fôlhas intermediarias do especimen tipo de Cuba.

Esta semelhança é mais acentuada no especimen IB 3590 (7) colhido em Caçapava, Estado de São Paulo, em que as manchas, tanto no limbo como no peciolo, são em regra isoladas, arredondadas, alcançando cerca de 2 mm diametro, visiveis em ambos as faces da fôlha, porém mais caracteristicas na face superior, onde são ligeiramente salientes, com centro levemente deprimido, de cor branca suja, muitas vezes fendilhado ou completamente perfurado, e com estreita zona marginal marron escuro.

No especimen de Manaus, Amazonas (IB 4433) (8), as lesões são muito mais acentuadas do que nos dois especimens de São Paulo (Estampa 14, *E* a *H*). Ao passo que nas partes do limbo afastadas da nervura central, e mesmo na visinhança desta última nas fôlhas pouco atacadas, as manchas são isoladas, redondas e com os caracteres gerais que acabam de ser descritos, porém de dimensões que podem

(7) IB 3590 (USM 74479) Caçapava, Estado de São Paulo, Brasil, 4 de Junho de 1940. A. A. Bitancourt 859.

(8) IB 4433 (USM 90241) Praça São Sebastião, Manaos, Brasil, 4 de Agosto de 1942. A. A. Bitancourt 944.

alcançar 3 mm de diâmetro, nas fôlhas muito atacadas, na região da nervura central, as manchas coalescem de forma a acompanhar essa nervura em grande parte de sua extensão, principalmente na região da base da fôlha, em uma faixa continua ou apenas interrompida pela nervura principal e as nervuras secundárias, de contorno irregular, mas às vezes bem delimitado. Esta zona manchada estende-se até quase um centimetro de largura, de cada lado da nervura principal. Salvo para uma faixa marginal que pode ser muito estreita, até menos de 1 mm de largura, mas que é usualmente de 2 a 5 mm de largura, e de cor marron escura (*light seal brown* ou mais escuro) a mancha tem a coloração acinzentada caracteristica dos tecidos superficiais vasios de seu conteúdo celular e portanto cheios de ar. Estes tecidos brancos podem ser destacados com facilidade com a ponta de uma agulha, na forma de uma película com a aparencia da estearina.

As manchas são epifilas, muito raramente hipofilas e invisiveis na face oposta, salvo quando uma alteração necrótica sobreveio, estendendo-se para a outra face.

Conforme dissemos, nenhuma frutificação da forma imperfeita foi encontrada nas lesões dos especimens do Brasil. A descoberta de ascomas no especimen de Cuba, levou-nos — porque acreditavamos então que se tratava de uma mesma doença — a um exame mais minucioso dos diversos especimens de São Paulo nos quais, em exames anteriores, não tinham sido encontrado frutificações. No especimen IB 2951 foram vistos, nas lesões ao longo da nervura central, na face superior de uma fôlha, alguns ascomas muito pequenos (Est. 14, *E*), medindo aproximadamente 38 a 55 μ de diâmetro, por 15 a 20 μ de espessura, subcuticulares e cobertos ainda pela cutícula mais ou menos dilacerada, sem epitecio nitidamente diferenciado, com conteúdo pseudoparenquimático hialino, onde se acham alguns ascos globosos de cerca de 12 μ de diâmetro. Estes ascos contém até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos, retos ou ligeiramente curvos, medindo 10-12 x 3-4 μ (Est. 14, *F*). Os ascomas são portanto bem menores do que os do material de Cuba, porém seus ascos e ascosporos têm dimensões comparáveis.

Apesar da presença de ascomas nas lesões de um dos especimens brasileiros, julgamos, como dissemos, que a doença que os ataca é causada por um fungo diferente de *Sphaceloma mangiferae*. Pela sua sintomatologia a doença do Brasil deve ser incluida na categoria das antracnoses (JENKINS, 1933), ao passo que a de Cuba melhor será definida como uma verrugose.

ISOLAMENTOS CULTURAIS E INOCULAÇÕES EXPERIMENTAIS

Conforme mencionamos anteriormente, foram feitos isolamentos, em cultura pura, dos fungos encontrados nas lesões do especimen tipo de Cuba (IB 4416) e de um dos especimens da doença brasileira (IB 2951). Afim de comparar estes dois fungos foram feitos estudos culturais e inoculações experimentais a partir das culturas isoladas, estudos que serão relatados a seguir.

ISOLAMENTOS EM CULTURAS PURAS

Do especimen IB 2951 colhido em 29 de Junho de 1938 foram feitas, em 5 de Julho, culturas de tecido, uma vez que não se encontraram frutificações no primeiro exame do material. O fungo foi isolado de acordo com a técnica usual (BITANCOURT e JENKINS, 1939) em que pequenas secções transversais das lesões, feitas à mão livre, com uma navalha, são colocadas na superficie de gotas de meio de cultura de agar de batata-dextrose, sôbre láminas, e mantidas em camara úmida.

Destas secções, na parte correspondente à superficie das lesões, desenvolveram-se depois de 24 horas os primeiros filamentos micelianos, numerosos, curtos e muito refringentes, de crescimento muito lento, caraterísticos dos fungos das Elsinoaceas. Depois de cerca de 6 dias os talos, plenamente visiveis a olho desarmado, foram transferidos para tubos de cultura. Destes um só foi conservado para os estudos subsequentes e constitue o isolamento 298D, da coleção de culturas da Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo.

O material de Cuba, que constitue o especimen tipo IB 4416, foi colhido em 23 de Julho de 1942, e depois de secado à sombra, trazido para São Paulo, onde em 21 de Agosto foram feitas culturas monoconídicas. As conidias, destacadas com uma agulha flambada, da superficie das lesões, foram espalhadas na superficie de gotas de agar de batata-dextrose dispostas sôbre uma lámina de vidro mantida em camara úmida. Depois do primeiro desenvolvimento, no fim de 24 a 48 horas, os pequenos talos incipientes foram removidos para o centro de outras gotas de agar, onde se desenvolveram até se tornarem visiveis a olho desarmado. Foram então transferidos para tubos de cultura. Um desses tubos foi conservado, sob o número 482 E, para os estudos que serão relatados a seguir.

Diversas tentativas foram feitas para se obterem culturas a partir dos ascosporos; em nenhum caso foi possivel conseguir-se a germinação deles.

CARACTERES CULTURAIS

Os talos da cultura 298D, desenvolvidos às temperaturas de 18 a 21,5° centigrado, são finamento convolutos, bastante elevados acima do meio e praticamente não desenvolvidos em profundidade, glabros e levemente úmidos na periferia, que tem coloração parda clara, cobertos de uma finissima penugem branca na parte central, mais elevada, que tem coloração variavel, parda, às vezes levemente rosada com escurecimento de areas irregulares. A 27° as convoluções são menos marcadas e a superficie é glabra. A 14° e a 9° o talo é mais escuro e de superficie viscosa.

Os talos da cultura 482 E, nas temperaturas de 27 e 31°C, apresentam convoluções como a cultura anterior, porem em geral maiores e menos numerosas e cobertas de uma penugem branca mais abundante e longa. Esta penugem também cobre o talo das culturas crescidas em diversas temperaturas, de 8 a 35°C, ao contrario da cultura anterior, que é glabra a 14° e a 9°. Como esta, entretanto, a cultura 482E tem, nas temperaturas de 27 e 31°, uma margem úmida e glabra.

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO EM CULTURA

Para estudar a influência da temperatura no desenvolvimento do fungo em cultura foram preparadas 32 caixas de Petri com meio de agar de batata-dextrose (meio C, BITANCOURT e JENKINS, 1942) de cada um dos dois isolamentos disponiveis. Para semear essas caixas foram preparados tubos preliminares de agar batata-dextrose em que o inoculo é esfregado em toda a superficie inclinada do agar de forma a produzir o desenvolvimento de numerosos talos que são transferidos para o centro das caixas de Petri quando medem cerca de 1 mm de diametro. As culturas foram colocadas numa serie de 8 termostatos com as temperaturas de 4, 9, 14, 18, 21, 27, 31 e 35° centigrados. Estas temperaturas se mantiveram, durante todo o tempo da experiência, nos valores indicados, com variação inferior a 0°5, salvo para as temperaturas de 4° e 9°, onde a variação alcançou cerca de 1°. Em cada termostato havia, pois, 4 caixas de Petri de cada cultura. No fim de um mês os talos desenvolvidos dentro das caixas de Petri foram medidos, tomando-se por medida a media entre o diametro menor e o diametro maior apresentado pelo talo. A medida final consistio na media das 4 medição das caixas de Petri de cada temperatura, para cada isolamento, salvo em alguns casos em que a media se estabeleceu a partir de 1 a 3 medições, por se terem conta-

minado algumas das caixas. Os resultados constam da tabela 1 e culturas representativas desta experiencia estão representadas na Est. 14, *I*.

TABELA 1

Diâmetro medio, em milímetros, dos talos das culturas 298 D e 482 E cultivadas em meio de agar de batata-dextrose nas temperaturas indicadas

Temperatura	4	9	14	18	21	27	31	35
Cultura 298 D	3,2	7,0	7,2	14	17,5	12,5	3,9	0
Cultura 482 E	1,5	4,8	6,7	12,2	16,5	20,0	18,8	9,5

Por alguns dos seus caracteres culturais, e mais especialmente pelas suas temperaturas ótima e máxima de desenvolvimento em cultura, o fungo da verrugose da mangueira de Cuba distingue-se bem do fungo da doença brasileira, o que confirma a conclusão a que chegamos, de que esta última não é a verrugose, a qual não existe atualmente no Brasil.

INOCULAÇÕES

Em 4, 6 e 17 de Maio de 1943, transferências das duas culturas foram utilizadas para inocular fôlhas novas de pequenas plantas de mangueira, em vaso. As transferências foram feitas a partir de culturas em tubos, para caixas de Petri contendo meio de agar de batata-dextrose, coberto com um disco de celofane. Devido ao crescimento extremamente lento das Elsinoaceas, as caixas de Petri são facilmente contaminadas, e para o evitar elas devem ser protegidas com uma tira de algodão hidrófilo que é inserida no intervalo entre as paredes laterais do fundo da caixa e de sua tampa, mantendo-se assim um vedamento perfeito contra esporos e bacterias que normalmente se introduzem por esta via no interior das caixas de Petri, contaminando-as quando conservadas por mais de 3 a 4 semanas. O algodão, entretanto, não impede completamente, no interior da caixa, a ventilação necessaria para o bom desenvolvimento do fungo.

No prazo de 5 a 6 semanas, os talos do fungo alcançam dimensões suficientes para o preparo do inóculo; a película de celofane é removida da superficie do meio de cultura, destacando-se o talo, sem levar consigo qualquer parcela do meio. O talo, raspado, com um escalpelo, da superficie da celofane, é picado em fragmentos muito pequenos, os quais são espalhados na superficie de face superior de fôlhas muito novas das brotações terminais de pequenas plantas de

mangueira, em vaso. As plantas são mantidas durante 48 horas debaixo de uma tenda de lona no interior da qual é pulverizada uma neblina muito fina de agua, de forma a manter uma umidade de 100% durante todo esse tempo. Sendo a neblina muito fina, a agua que escorre das fôlhas inoculadas não é suficiente para carregar o inóculo, que dessa forma, findas as 48 horas, encontra-se na maior parte ainda na superficie das fôlhas. Os vasos são em seguida removidos para uma estufa de vidro.

Esta técnica de inoculação representa, na opinião dos autores, um aperfeiçoamento muito satisfatório da técnica utilizada em seus trabalhos anteriores, em que as culturas eram produzidas diretamente no meio de agar, o qual era sempre trazido em maior ou menor quantidade na superficie dos orgãos inoculados, dada a dificuldade de o destacar completamente do talo do fungo. O emprego do disco de celofane, preconizado por JACOBSTHAL (BIRCH-HIRSCHFELD, 1934) para outros tipos de estudos, remove completamente esse inconveniente. De outro lado a nova técnica dispensa inteiramente os chumaços de algodão hidrófilo anteriormente usados para suportar o inóculo e pô-lo em contato com os orgãos inoculados, com maior ou menor risco de feri-los ou prejudica-los de qualquer modo. O simples espalhamento do inóculo, deixando os orgãos da planta em condições naturais, sem cobri-los de envoltorios impermeaveis destinados a garantir a umidade necessaria, reproduz as condições naturais da infecção de maneira muito mais satisfatoria.

No dia 4 de Maio de 1943 foi inoculado dessa maneira, com a cultura 482E, um broto terminal de uma mangueira. A mesma planta tinha outro broto, que não foi inoculado para servir de testemunha. Cada broto continha cerca de 8 fôlhas em diferentes estados de desenvolvimento, algumas apenas de alguns milímetros e constituindo a parte do broto ainda não desenvolvida, as outras de dimensões variaveis, tendo entretanto as maiores menos da metade das dimensões de fôlhas completamente desenvolvidas. No dia 6 do mesmo mês outra mangueira foi inoculada da mesma maneira com a cultura 298D. No fim de uma semana podiam ser vistas numerosas lesões nas fôlhas inoculadas com a cultura 482E (Est. 13, *C*) mas nenhuma nas fôlhas inoculadas com a cultura 298D e nas fôlhas testemunhas. Em 17 do mesmo mês foram inoculados 2 brotos em desenvolvimento, de uma mangueira, um com a cultura 482E e outro com a cultura 298D. Um terceiro broto da mesma planta não foi inoculado. Confirmou-se a experiência anterior, cobrindo-se de lesões as fôlhas do broto inocula-

do com a cultura 482E, e ficando indenes as fôlhas inoculadas com a cultura 298D e as testemunhas.

As lesões eram todas pequenas, visiveis nas duas faces das fôlhas e mais ou menos esparsas, mas a maioria se encontrava ao longo da nervura principal. Elas se cobriram imediatamente, na face superior, ou seja a face inoculada, com um denso revestimento de conidiofóros e conidias, perfeitamente idênticos aos do especimen donde fôra isolado o fungo. Como em Cuba, as fôlhas menores perderam a flexibilidade das fôlhas novas, tornando-se quebradiças, e algumas se destacaram da haste.

MANGO SCAB

Abstract

This study of what is here termed "mango scab" is based particularly on leaf specimens of the disease collected in July 1942 at Santiago de las Vegas, Cuba, and leaf, stem and fruit specimens collected in Florida, 1942, 1943 and 1944. Other leaf specimens regarded as the same disease were collected at Orlando, Fla. in 1937 and in Porto Rico and Canal Zone in 1939. A similar although apparently not identical disease provisionally called "the Brazilian mango disease", was found on mango leaves in São Paulo and Manaos, Amazonas, in 1938 and 1942, respectively.

On young mango leaves, spots more often originate on the lower side and penetrate the tissue becoming visible above. They are circular to slightly angular, 0.1 to 1.5 mm. in diameter although on the nerves the longer axis reaches 3 mm. in length. On the surface originally infected the spots are dark brown to black; in the central area where densely covered with conidiophores of the pathogen they are "olive buff". On the opposite surface they are light brown to nearly black. Premature leaf fall is engendered.

On leaves of intermediate development the spots remain small rarely exceeding 1.5 mm. in diameter and usually are less than 1 mm. in diameter; where abundant to the point of coalescence they are relatively extensive. In this case the intervening tissue may be killed, forming an extensive irregular black spot. This necrosis appears to result from the invasion of secondary organisms, e. g. Colletotrichum gloeosporioides, or from the abundance of scab lesions. Scab lesions on older leaves are more prominent than on younger leaves. Fructifications of the imperfect stage have mostly disappeared on these older leaves.

On fully hardened leaves the spots present a distinct aspect; instead of numerous small, salient, circular spots, cinnamon buff, in color, generally darker to black at the center and of waxy appearance, there are larger spots, with well delimited, although sometimes irregular outlines on the upper surface. These spots are slightly raised with a narrow brown margin and the entire central part dirty white owing to the absence of cell contents of the several superficial cell layers of the hyperplastic tissue of the spot. There are all transitions between the spots of waxy appearance and the larger grayish white spots, which reach 5 mm. in diameter, but in general are not more than 1 to 1.5 mm. in diameter. On the surface of these spots viewed through a lens of strong magnification may be seen small dark bodies which are the ascomata of the perfect stage, or else fruiting structures of secondary fungi.

The symptomatology of the disease on the specimens from Florida corresponds closely to that on the specimens from Cuba, except that ascomata of the pathogene were not observed.

On stems irregular grayish blotches are formed and on young fruit grayish to grayish brown spots with dark margins.

The pathological anatomy of the lesions of mango scab resembles that of citrus scab (sour orange scab), but the hyperplastic tissue is less developed.

Awaiting definite demonstration of the genetic relationship of the two stages of the pathogene of mango scab the conidial stage is described as Sphaceloma mangiferae and the perfect stage as Elsinoë mangiferae. In general morphology S. mangiferae is similar to S. fawcetti.

Cultural comparisons were made with the isolations from the Cuban and Brazilian specimens. At constant temperatures the Cuban fungus developed best at approximately 27° C, whereas the Brazilian fungus produced the most growth at 21° C. At 35° C the Cuban fungus produced appreciable growth, that from Brazil no growth at all.

In inoculation experiments infection on young mango leaves was obtained with the Cuban fungus but not with that from Brazil.

BIBLIOGRAFIA

BIRCH-HIRSCHFELD, L. — 1934 — Über die Wirksamkeit der Extrakte von auf Zellophanagar gezüchteten Staphylokokken. *Zeit f. Immunitätsf.*, 81: 260-285,

BITANCOURT, A. A. & A. E. JENKINS — 1938 — New species, hosts and distribution records of Elsinoë and Sphaceloma. *Chronica Botanica*, 4: 388-389.

BITANCOURT A. A. & A. E. JENKINS — 1939 — Ciclo evolutivo de Elsinoë australis Bitancourt & Jenkins, agente da verrugose da laranja doce. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 10: 129-146.

BITANCOURT, A. A. & A. E. JENKINS — 1942 — New discoveries of Myriangiales in the Americas. *Proc. Am. Sci. Congr. 8 th*, Washington, 1940, 3: 149-172.

CUNNINGHAM, H. S. — 1928 — The histology of lesions produced by Sphaceloma fawcetti Jenkins on leaves of Citrus. *Phytopath.*, 18: 539-545.

JENKINS, A. E. — 1933 — Application of the terms "anthracnose" and "scab" to plant diseases caused by Sphaceloma and Gloeosporium. *Phytopath.* 23: 389-390.

JENKINS, A. E. & A. A. BITANCOURT — 1941 — Revised descriptions of the genera Elsinoë and Sphaceloma, *Mycologia*, 33: 338-340.

JENKINS, A. E. & A. A. BITANCOURT — 1944 — Myriangiales selecti exsiccati. *Bol. Soc. Bras. Agronomia*, 7: 153-166.

RUEHLE, G. D. — 1944 — Diseases and pests of the mango. Trabalho apresentado no *5th Annual Mango Forum*, West Palm Beach, Florida (mimeografado).

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 12

Fig. *A* — Folha muito nova de mangueira, face inferior, Santiago de las Vegas, Cuba, 23 de Julho de 1942, BITANCOURT 927, × 1.
Fig. *B* — Face superior da mesma folha, × 1.
Fig. *C* — Detalhe de *A*, × 5.
Fig. *D* — Detalhe de *B*, × 5.
Figs. *E* e *F* — Partes superior e inferior de uma folha mais desenvolvida, face superior, × 1.
Figs. *G* e *H* — Face inferior da mesma folha, × 1.
Figs. *I* e *J* — Faces superior e inferior de uma folha completamente desenvolvida, *a*, lesão representada em *K*, *a*. × 1.
Fig. *K* — Detalhe de *I*, *a*, uma lesão antiga, *b*, ascomas, × 5.
Fig. *L* — Frutificações de *Sphaceloma mangiferae*, *a*, conidióforos curtos, piriformes; *b*, conidióforos alongados, geniculados; *c*, conídias; × 500.
Fig. *M* — Ascosporos de *Elsinoë mangiferae*, *a*, dentro de um asco; *b*, livres; coloridos com azul algodão C4B; × 500.
Fig. *N* — Ascoma; *a*, epitécio; *b*, ascos; *c*, ascosporos; *d*, parede externa da epiderme do hospedeiro; *e*, parênquima em paliçada; × 500.
Figs. *O* a *R* — Especimens da Florida, Estados Unidos; *O*, face inferior de uma folha, × 1. *P*, face superior, × 7. *Q*, haste, × 7. *R*, frutas, × 1.

Fot. BITANCOURT e RODRIGUES (*A* a *N*) e TAYLOR (*O* a *R*).

Estampa 13

Figs. *A* e *B* — Duas frutas representadas na estampa 12, *R*, × 4.
Fig. *C* — Folhas de mangueira inoculadas em 17 de Maio de 1943 com a cultura 482E de *Sphaceloma mangiferae* e fotografadas em 5 de Junho de 1943; × 1.

Fot. TAYLOR (*A* e *B*) e RODRIGUES (*C*).

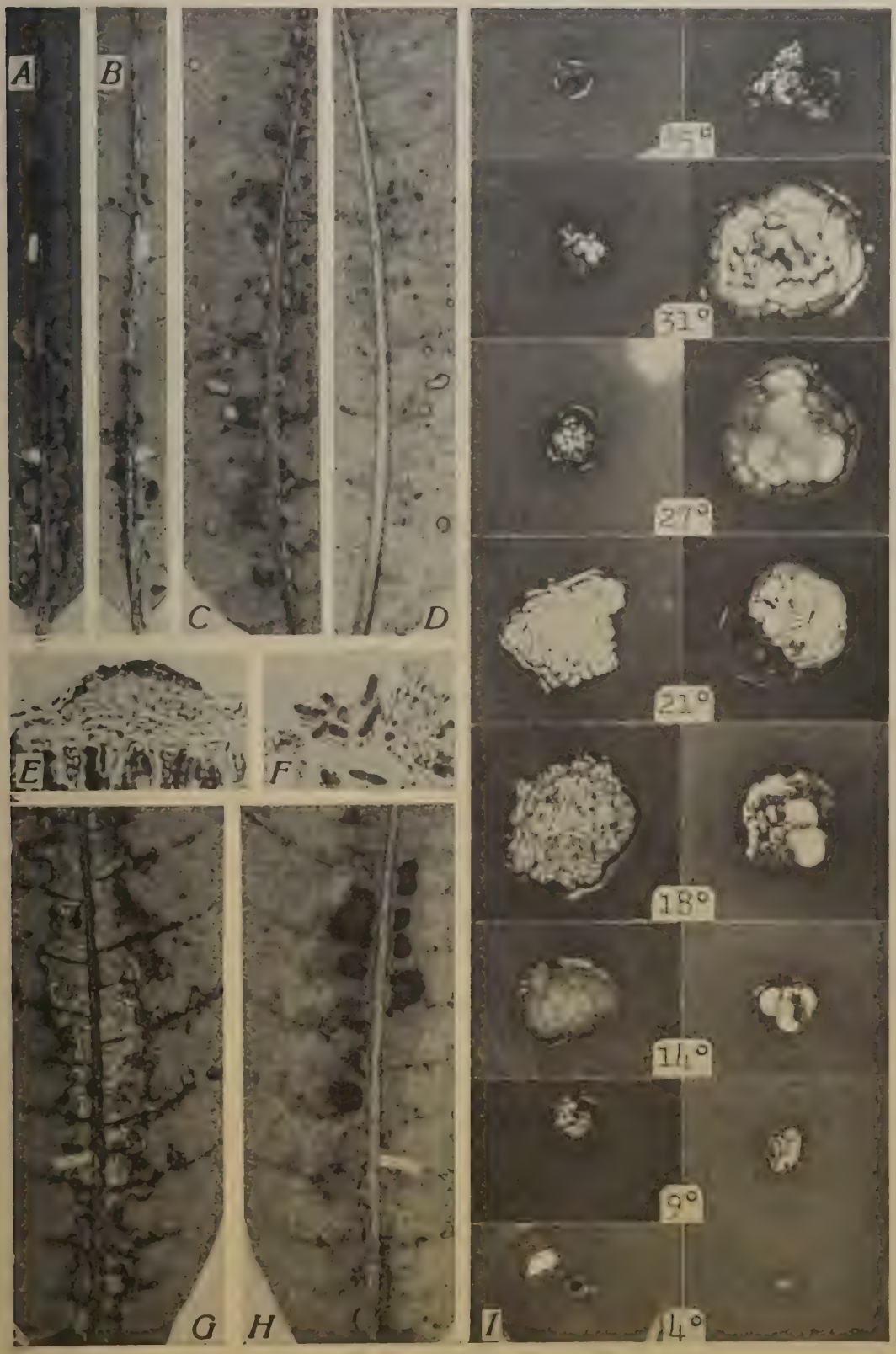
Estampa 14

Figs. *A* e *B* — Faces superior e inferior da nervura mediana de uma folha de mangueira, Caçapava, E. de S. Paulo, 4 de Junho de 1940, A. A. BITANCOURT 859. × 1.
Figs. *C* e *D* — Faces inferior e superior de uma folha de mangueira, Manaos, Amazonas, 4 de Agosto de 1942, A. A. BITANCOURT 944. × 1.
Fig. *E* — Ascoma de uma lesão da folha representada em *A*. × 500.
Fig. *F* — Ascosporos coloridos com azul algodão C4B. × 500.
Figs. *G* e *H* — Faces superior e inferior de uma folha do mesmo especimen que *C* e *D*. × 1.
Fig. *I* — Culturas de *Sphaceloma mangiferae* de Cuba (Cult. 482E, à direita) e de *Sphaceloma* sp. de São Paulo (Cult. 298D, à esquerda) desenvolvidas em meio de agar de batata-dextrose a diversas temperaturas durante um mês. × 1.

Fot. BITANCOURT e RODRIGUES.

A
C
E
G
B
D
F
H
I
J
K
a
b
b
a
c
a
b
M
d
a
d
c
b
b
c
N
e
O
P
Q
R

A
B
C


A
B
C
D
E
F
G
H
I
35°
31°
27°
21°
18°
14°
9°
4°

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO GÊNERO "PROTONECTARINA DUCKE, 1910" (HYM. VESPIDAE)

POR

R. L. Araujo

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com a estampa 15

Protonectarina DUCKE, 1910

DUCKE, A., 1910, Ann. Mus. Nat. Hung., 8: 464, 477-8; idem, 1914, Zool. Jahrb., Syst., 36 (2/3): 305, 306, 312; idem, 1918, Rev. Mus. Paul., 10: 326; BEQUAERT, J., 1944, Bull. Mus. Comp. Zool., 94 (7): 254; idem, 1944, Rev. de Ent., Rio, 15 (1/2): 99.

O gênero *Protonectarina* foi criado por DUCKE para a espécie *sylveirae* que fora descrita por SAUSSURE na Divisão *Alpha* do gênero *Polybia*. BEQUAERT, em 1944, designa tipo para essa Divisão com o fim de torná-la sinônima de *Polybia*, sem que se possa perceber a vantagem desse procedimento, uma vez que as "Divisões" de SAUSSURE não constituem unidades sugeitas às Regras de Nomenclatura.

Já em 1903, IHERING refere-se à semelhança de *P. sylveirae* com as espécies dos gêneros *Brachygastra* e *Charterginus*, devido à forma geral, à puncturação abdominal e à arquitetura do ninho; chega a sugerir a inclusão da espécie em um dos dois mencionados gêneros, mas não lhe resolve a posição genêrica.

Diagnose do gênero: Polibiíneos de ocelos de tamanho normal, porém largamente afastados entre si; palpos labiais de 4 artículos (destituidos da cerda característica de outros gêneros); maxilares de 6 artículos; escutelo não projetado sôbre o postescutelo; postescutelo não dividido em duas zonas e com margem em ângulo obtuso; primeiro segmento abdominal muito curto, subséssil de ápice muito menor que a base do II segmento; demais segmentos não comprimidos; clípeo bem mais largo que alto; dorso do tórax abaulado. Nidificação fragmocítara perfeita, quase esférica.

Genótipo: *Protonectarina sylveirae* (SAUSS., 1854) DUCKE, 1910. (= *Polybia sylveirae* SAUSS., 1854). Monotipia.

Distribuição geográfica: É gênero exclusivamente neotrópico, da sub-região Brasiliana.

Protonectarina sylveirae (SAUSS., 1854)

Polybia sylveirae SAUSS., 1854, Ètt. fam. Vesp. 2: 171-2, n.º 6; est 22, fig. 2; SMITH, F., 1857, Cat. Hym. Brit. Mus., 5: 124; FOX, W. J., 1898, Proc. Acad. Nat. Sci. Philadephia, 3: 450; DALLA TORRE, 1894, Hym. Cat., 9: 163 (*P. sylveibae*); BRÈTHES, J., 1903, An. Mus. Nac. B. Aires (3) 2: 28; IHERING, R.,

1903, Ann. Soc. Ent. Fr., 72: 152-3 (ninho); idem, 1904, Rev. Mus. Paul., 6: 181, 250; BRÈTHES, J., 1906, An. Mus. Nac. B. Aires (3) 6: 313; DUCKE, A., 1906, Rev. d'Ent., Caen, 25: 7; idem, 1907, Bull. Mus. Goeldi, Pará, 5: 171, 181; idem, 1908, Rev. d'Ent., Caen, 27: 85; MEADE WALDO, G., 1911, Ann. Mag. Nat. Hist. (8) 7: 107-8; BEQUAERT, J., 1944, Rev. de Ent., Rio, 15 (1/2): 99 (citação do nome original).

Polybia enxuy SMITH, F., 1863, Trans. Ent. Soc. Lond. (3) 1, 6: 511, n.º 5; DALLA TORRE, 1894, Hym. Cat., 9: 163 (*P. enxius*).

Protonectarina sylveirae, DUCKE, A., 1910, Ann. Mus. Nat., 8: 477-8; idem 1918, Rev. Mus. Paul., 10: 326; BERTONI, A. W., 1918, An. Cient. Parag. (2) 3: 204; FONSECA, J. P., 1926, Rev. Mus. Paul., 14: 171.

Redescrição:

♀ — Cabeça, vista de frente (estampa 15, fig. *A*) de aspecto hirsuto, dada a abundância da pilosidade do vértice, olhos e margem apical do clípeo; ligeiramente mais larga que alta; linha do vértice pouco inclinada aos lados e em saliência arredondada no centro; vista de cima, mais larga que o mesotórax; ao centro, duas vezes e meia mais curta que larga, francamente côncava. Fronte conspicuamente abaulada, recoberta de pilosidade clara, brilhante, aveludada e recumbente, entremeiada de pilosidade hirta, bem menos densa que a de fundo, porém patente e alongando-se para o vértice; não ha puncturações visíveis; áreas paraoculares em fraco declive; triângulo interantenal pouco saliente; linha frontal nítida, porém curta, ocupando um terço da distância das antenas ao ocelo anterior. Vértice brilhante, impuncturado; pilosidade tão densa quanto a da fronte; cômoro ocelar largo, abaulado, pouco elevado; triângulo ocelar (LOO:LOP::7:7) de base ligeiramente maior que os lados. Genas impuncturadas, apenas mais largas que os olhos; de perfil, lustrosas; densamente revestidas de pilosidade recumbente e os poucos pêlos altos, mais curtos e esparsos que o dos olhos; terço central e lado externo, paralelo aos olhos; terço inferior estreitado, medindo, junto das mandíbulas, metade da largura do terço médio; junto à margem externa, glabro, com um lustre azulado e umas poucas e diminutas puncturas; terço superior pouco mais estreitado que o inferior, formando ângulo arredondado com o terço médio; sutura occipital nítida, profunda, estendendo-se até o terço inferior das genas. Occipício brilhante, densamente piloso junto à sutura occipital; post-genas fortemente declives, metade inferior muito lustrosa e de lustre azulado; sulcos laterais das postgenas muito profundos, quase direitos, apenas curvados para fora e terminados ao nível do declive das postgenas. Clípeo fraca porém uniformemetne abaulado; pouco brilhante, com algumas diminutas puncturas esparsas; junto à margem distal, pilosidade erecta, esparsa, que dimine de tamanho à medida que se aproxima do meio do clípeo; franja marginal longa; mais largo que alto (22,5:19); toca lateralmente os olhos em extensão equivalente à metade da largura do côndilo antenal; lóbulo distal mediano muito pouco saliente, arredondado; margem superior moderamente convexa; fosseta sub-antenal junto à sutura látero-superior; sutura sub-antenal quase nula. Espaço óculo-malar curto, pouco menor que metade da base das mandíbulas. Olhos normais, pouco salientes, densamente pilosos, mais afastados ao nível do ocelo anterior que na região central do clípeo (27,5:17); sinus ocular de largura normal, pouco profundo. Mandíbulas alongadas, duas vezes e meia mais longas que largas, ligeiramente mais longas que o escapo das antenas incluindo o côndilo; margem superior direita, metade basal das margem inferior, oblíqua, e a distal ligeiramente curva; superfície externa com uma zona triangular, opaca, alongada e que avança além do meio e em direção à base do primeiro dente; aos lados dessa zona triangu-

lar plana a superfície das mandíbulas é convexa; na margem inferior, principalmente junto à base, algumas puncturas irregulares, esparsas; no resto, brilhantes, lisas, com puncturas irregulares, cada uma com longo pêlo dourado, hirto; quatro dentes, os centrais sub-iguais, agudos, o superior pequeno, arredondado, o inferior agudo, com a margem inferior recurva; internamente tres dentes secundários, triangulares, curtos. Palpos labiais de quatro artículos decrescentes em grossura; com cerdas fortes, esparsas, adensadas no ápice dos segmentos; I sinuado, de ápice chanfrado e pouco alargado; II cilíndrico, direito; III direito, com a metade distal ligeiramente alargada; IV com a margem interna direita e a externa côncava; comprimentos relativos: I:51; II:42; III:24; IV:29. Palpos maxilares de seis artículos, mais densamente providos de cerdas que os labiais; I cilíndrico, sinuado junto da base, truncado no ápice; II obcônico, metade distal de lado interno fortemente expandida; III semiglobular, alongado, fortemente chanfrado no ápice; IV alongado, gradualmente dilatado; V de formato semelhante ao IV; VI subfusiforme, alongado; comprimentos relativos: I:33; I:12; III:22; IV:29; V:21; VI:33. Antenas, vistas em grande aumento, recobertas de pilosidade muito curta, clara e recumbente; escapo e pedicelo com numerosas cerdas esparsas, erectas e amareladas; flagelo de superfície áspera, côndilo densamente puncturado; escapo conspicuamente encurvado, de grossura praticamente uniforme; côndilo globular, pouco mais largo que alto; pedicelo constricto junto à base e os lados convexos para o ápice; comprimentos relativos: escapo: 38½; pedicelo 12: flagelo: I:15; II:9; III:9; IV:8; V:8; VI:8; VII:9; VIII:8; IX:8; X:13; em largura máxima gradualmente crescentes até o X (7½ a 13), o último ligeiramente mais largo na base que o V, distalmente afilado e de extremidade arredondada.

Tórax, visto de cima, aproximadamente retangular, ligeiramente expandido à altura das tégulas e estreitado posteriormente, margem anterior truncada; lateralmente, ambos os lados igualmente oblíquos; muito pouco mais longo que alto. Protórax truncado na frente, pouco alargado para os ângulos umerais; carena pronotal anterior pouco saliente, voltada para cima, cortante; puncturação irregularmente disposta, mais esparsa que a da mesopleura; as puncturas, de tamanhos irregulares e de contorno pouco nítido; densamente piloso, fosco; no ângulo ântero-ventral uma carena forte, não cortante, em toda sua extensão paralela à carena pronotal anterior; acima do meio, posteriormente, a fosseta pronotal, profunda, circular, muito nítida; "crista" nítida, saliente, não cortante, a princípio paralela à margem anterior, depois do ângulo umbral, voltada para trás e perdendo gradualmente altura até perto do lóbulo posterior; lóbulo posterior diminuto limitado por carena delgada que é precedida de depressão nítida; margem posterior de lados praticamente retos e centro quase direito. Mesopleuras densamente recobertas de pilosidade curta, brilhante recumbante; fortemente abauladas; densa e regularmente puncturadas; as puncturas, circulares, de bordos perfeitamente nítidos; ao alto larga depressão lisa, ligada à sutura mesopleural; esta é larga, pouco profunda, grosseiramente estriada ao fundo; sua parte terminal, mais estreita, voltada para trás e terminando bem antes da margem; sulco episternal mediano ausente; expansão sub-alar convexa, bem desenvolvida, densamente pilosa. Mesosterno com puncturação diminuta, porém densa; superiormente, larga depressão junto da fosseta mesosternal; sutura mesosternal mediana muito fina, porém nítida; dentes mesosternais curtos, fortes, precedidos de profunda depressão na linha mediana. Proepisterno densamente piloso, sem puncturação aparente; as margens inferiores côncavas; as zonas ínferolaterais um pouco elevadas; lateral-

mente curvo; margem anterior levantada, não revirada; processo occipital bissinuado, superiormente dilatado; extremidade glabra e brilhante; na dilatação superior e logo adiante da base, densamente puncturado e piloso. Mesonoto tão longo quanto largo, fortemente abaulado; mais densamente puncturado que as mesopleuras, as puncturas um pouco menores mas também regulares; brilhante, densamente piloso; a pilosidade erecta, de um tom acastanhado; a pilosidade recumbente especialmente densa ao centro, onde é argêntea; largamente arredondado na frente; ligeiramente mais largo que longo; sutura notal mediana nítida, atingindo a elevação máxima do mesonoto; parapsides alargadas para a frente, em declive abrupto; na frente das postesgulas um sulco profundo de largura uniforme, que se dirige para o ângulo posterior do pronoto; sulcos parapsidais com margem cortante perto das axilas e terminados ao nível do ângulo posterior do pronoto. Tégulas ovalado-oblongas, pouco abauladas; margem externa reta ao centro; menos densamente piloso que o pronoto. Escutelo cerca de duas vezes mais largo que longo; densamente puncturado; densa pilosidade erecta, escurecida; em posição oblíqua quanto ao mesonoto; quase plano na zona central e com as margens em declive; densa e irregularmente puncturado; as puncturas bem maiores que as do mesonoto; em alguns exemplares aparecem também puncturas duas vezes maiores, e esparsas em meio à puncturação geral; em um dos exemplares (São Paulo, Sp.) o escutelo é largo e regularmente deprimido na sua maior parte, sendo elevados somente a margem posterior e os lados. Axilas profundas lisas, brilhantes; carena transcutelar nítida, cortante; cristas escutelares elevadas, delgadas, inclinadas para trás. Postescutelo em posição praticamente vertical, cerca de duas vezes mais estreito que o escutelo; uniformemente abaulado nos lados e plano no disco; puncturação menos densa que a do escutelo; as puncturas mais uniformes e limitadas ao disco; pilosidade idêntica à das regiões visinhas; ângulo inferior muito aberto; depressões metanotais pouco profundas, oblongas, lisas, brilhantes, densamente pilosas; metapostnoto encurvado, laminar, cortante, fortemente piloso; segmento metanotal pouco profundo, de superfície áspera; pilosidade restricta à carena que o separa da depressão metanotal; segundo peritrema quadrangular, regularmente abaulado, densamente piloso. Propódeo quase vertical, densamente piloso; pilosidade clara, brilhante, basta; superfície dorsal brilhante, puncturação irregular, mais adensada nos ângulos ântero-superiores; lateralmente sem brilho, de superfície áspera; puncturação rara e menor; sem traços de estriação transversal; ao centro, em toda a extensão, uma depressão profunda, alargada para baixo, com puncturação esparsa; expansões apicais do propódeo pouco salientes, delgadas precedidas de sulco profundo e estreito; dentes do propódeo ("válvulas") curtos, brilhantes, densamente pilosos, formando a curvatura um recinto oblongo, de margem interna delgada. Metapleuras com a superfície semelhante à dos lados do propódeo, de puncturação mais esparsa e menos densamente pilosas; zona superior na maior parte levemente abaulada em declive forte junto à primeira fosseta metapleural, ligeiramente estreitada para baixo, onde termina em ângulo agudo; zona inferior elevada na região central inferior; pequena expansão laminar triangulíforme junto às expansões apicais do propódeo. Asas hialinas, de nervuras castanho-avermelhadas; muito discreto lustre amarelado na célula mediana. Asas anteriores: Células: C estreitíssima, de largura uniforme; M dois terços do comprimento da asa, fortemente estreitada em ambas as extremidades; superiormente direita; Sm cerca de metade do comprimento de M, ligeiramente estreitada no meio; dilatação semicircular inferior junto à base; ápice oblíquo; A ampla, pouco mais

curta que M, extreitada para as extremidades; D1 inferiormente direita, dilatada junto da origem da nervura cubital, de comprimento equivalente ao da Anal; D2 triangular, estreitamente aberta na base; lados direitos, ápice largo, ligeiramente sinuado; D3 retangular, base sinuada, bordo superior fracamente convexo, dilatado na Cub2; bordo inferior a princípio fracamente convexo e depois côncavo; ápice côncavo; Cub1 grosseiramente retangular, ligeiramente mais curta que a D3; base fortemente oblíqua, lados sinuados e ápice direito; Cub2 estreita, bem alta; lado inferior um quarto do comprimento da Cub3; base dobrada abaixo do meio; lado superior inclinado e menos da metade do comprimento do inferior; ápice quase vertical, ligeiramente sinuado; Cub3 quadrangular ligeiramente alargada para o ápice, pouco mais longa que alta, lados superior e inferior ligeiramente côncavos; ápice fortemente sinuado; Cub4 amplamente aberta, maior que as duas antecedentes reunidas; lado superior quase direito; o inferior divergente; R do comprimento da D2, convexa no estigma, lado superior regularmente curvo, até a Cub2 direita, e inclinada para baixo, subindo depois, sinuadamente, para o ápice; A aproximadamente do comprimento da D1, subfusiforme; Ap1 elipsóide, do comprimento da D2; Ap2 de base e ápices sinuados; lado inferior divergente, direito; estigma oblongo, do comprimento da D3; paraestigma diminuto. Nervuras: C e Sc praticamente direitas; M regular porém fracamente côncava; Bas. sinuada, coincidindo com a Cub no último quarto do seu comprimento; Cub sinuada, sofrendo brusco desvio na célula Cub2, onde recebe as duas recurrentes a curta distância uma da outra; sobe muito pouco, obliquamente, reassume a direção primitiva, encurva-se ainda ligeiramente para cima para receber a transverso-cubital III, e ao formar a célula Cub4 é apenas vertigial; TrCub1 reta, oblíqua; TrCub2 ligeiramente encurvada; TrCub3 fortemente sinuada; nervulus curto, mui fracamente encurvado, interrompido antes de atingir a SubM; D direita, dobrando-se para baixo, em ângulo reto e descendo sinuosamente até a SubM, antes da qual sofre breve interrupção; SubM sinuada e ascendente até ao nervulus, depois praticamente direita e descendente. Asas inferiores cerca de uma vez e meia mais curtas que as anteriores; franja marginal de pêlos esparsa na região dos hamuli, em seguida progressivamente adensada até o ápice da asa; daí em diante os pêlos mantêm aproximadamente a mesma densidade; hamuli fortemente recurvos, diminuindo relativamente pouco de tamanho; a série inicia-se justamente sôbre a inserção da R e termina pouco antes da TrC; o número mais frequente é de 6 em uma asa e 7 na outra (mínimo 5-6, máximo 8-9). Células: M cerca de dois terços do comprimento da asa, lado inferior quase direito, dilatada superiormente, fortemente estreitada em ambas as extremidades; Sm cerca de metade da largura e do comprimento da M, apenas pouco dilatada inferiormente junto ao quarto distal; R pouco mais longa que a Sm, em ângulo agudo no terço basal, em seguida de lados quase paralelos; Cub1 muito estreita na base e com o dobro da largura no ápice; D1 iniciada na altura da metade da M, onde tem a mesma largura da Sm, alarga-se depois fortemente para o ápice; A bastante ampla, claramente limitada do lado de cima pela nervura anal até o bordo da asa.

Pernas anteriores: Coxas com puncturação fraca, esparsa, densamente pilosas; cônicas, largas; puncturação mais densa internamente junto do ápice; processo basal largo, convexo fortemente inclinado, de ápice obliquamente chanfrado e pouco estreitado; na superfície externa com larga excavação, seguida na coxa por sulco profundo. Trocânteres recurvos na base, alargados para o ápice. Fêmures bissinuados, engrossados no meio, pouco estreitados para as extremidades,

recurvos, ventralmente comprimidos, densamente pilosos, dorsalmente hirsutos; uma sutura circular destaca estreito anel basal. Tíbias encurvadas na base, fortemente engrossadas no meio, distalmente pouco atenuadas, largamente chanfradas no ápice, onde, no lado interno, ha profuda incisão; esporão tibial encurvado, largo na base, estreitado no meio, pouco dilatado apicalmente; velum largo na metade basal, estreitado para o ápice e ocupado quase toda a extensão do esporão; cerdas da margem dorsal principiando na metade do esporão e mais adensadas na extremidade; uma fileira lateral, espaçada, de cerdas robustas e longas. Metatarsos do comprimento dos três últimos segmentos tarsais, de lado paralelos; quarto proximal dobrado em ângulo muito obtuso; no meio da margem interna, uma pequena porém nítida elevação que marca o limite da excavação do metatarso; densamente piloso, especialmente na face inferior, onde ha densa guarnição de cerdas rijas, inclinadas. II e III segmentos sub-iguais, o II mais profundamente excavado que o I, ao ápice dos lóbulos tarsais, como no ápice da tíbia, providos de grupos de cerdas fortes; IV ainda mais profundamente excavado, desprovido dos grupos apicais de cerdas; V do comprimento dos dois antecedentes reunidos, duas vezes mais largos no ápice que na base; ápice excavado; garras tarsais ca. da metade do comprimento do V segmento, de extremidades aduncas, simétricas, internamente salientes no quarto basal onde ha longa e robusta cerda. Pernas medianas: Coxas trianguliformes, de metade do comprimento das tíbias, densamente recobertas de pilosidade clara e recumbente e providas de cerdas esparsas, hirtas, inclinadas; faces interna e externa fraca e regularmente abauladas; excavação que recebe o trocânter profunda; a superfície da coxa nesta face é plana e inclinada; fortemente estrangulada na base e dobrada para dentro, esta porção assim destacada é glabra e brilhante e, no lado interno, prolongada em saliência arredondada, e densamente pilosa na face de dentro. Trocânteres densamente pilosos; pilosidade mais fraca na face interna; encurvados, constrictos junto à base, dilatados para o ápice. Fêmures com a mesma pilosidade das peças anteriores; direitos, engrossados no terço proximal; com estreito anel basal destacado por sutura distinta; de comprimento pouco maior que o das tíbias. Tíbias com revestimento idêntico ao anteriormente descrito; quinto basal encurvado; dilatadas na articulação constrictas em seguida, depois gradual e levemente engrossadas até o terço distal, que é de grossura uniforme; dois esporões apicais, o externo maior, direito, o interno ligeiramente sinuado, ambos mui densamente revestidos de espículas alargadas na base e semi-recumbentes. Metatarsos dois quintos mais curtos que as tíbias, pouco menores que os restantes segmentos tarsais, ligeiramente engrossados em ambas as extremidades; revestimento piloso igual ao restante das patas, cerdas semierectas, especialmente densas na face inferior; grupos de fortes cerdas no ápice; II segmento pouco mais longo que o III, ligeiramente mais engrossado distalmente, muito pouco excavado no ápice, onde ha grupos de fortes cerdas; III de ápice mais fortemente excavado, com os mesmos grupos de cerdas láteroapicais; IV profundamente excavado no ápice, atingindo a excavação a metade do segmento e formando lóbulo salientes, dos quais o interno é ligeiramente mais desenvolvido e sem cerdas apicais: V quase do comprimento dos dois antecendentes reunidos, duas vezes mais largo no ápice que na base, excavado apicalmente e com dois pequenos lóbulos arredondados, dirigidos para a frente; garras tarsais longas, recurvas, dilatadas junto à base. Pernas posteriores: Coxas de formato semelhante às do par mediano, quase planas na face externa; face interna longitudinalmente elevada, com o centro dessa elevação deprimido; pouco estreitadas na base, onde a articulação é pouco saliente, desta-

cando-se uma pequena protuberância arredondada; a articulação principal do mesmo tipo da das coxas medianas. Trocânteres menos encurvados que os do par anterior, pouco menos engrossados ao ápice. Fêmures menos densamente pilosos que as tíbias; pouco dilatados no centro, ligeiramente comprimidos na face interna e pouco encurvados para fora; praticamente do comprimento da tíbia. Tíbias encurvadas e estreitadas na base, depois direitas e gradualmente engrossadas; esporão tibial interno comprimido, ligeiramente encurvado, com a extremidade afilada e dirigida para fora; mais longo que o externo; esporão externo achatado na metade proximal, direito, aguçado. Metatarsos do comprimento do restante do tarso, ligeiramente encurvados na base, em seguida direitos e de largura uniforme; II segmento ligeiramente mais longo que o último, de grossura praticamente uniforme; III de formato idêntico ao anterior, apenas ligeiramente engrossado para o ápice; IV, o menor, profundamente excavado no ápice, com os lóbulos simétricos; V pouco mais curto que o II, engrossado para o ápice, onde é ligeiramente excavado; garras tarsais simétricas, mais alargadas na base e mais aduncas que as dos pares anteriores.

Abdomen cônico, alongado, ligado ao tórax por curto pedicelo. I segmento (est. 15, fig. *B*) tão longo quanto sua largura no ápice; a parte penduncular, que corresponde a pouco menos de um quarto do comprimento total tem os lados moderadamente divergentes; em seguida os lados do segmento divergem mais fortemente até os tubérculos espiraculares, que são curtos, porém conspícuos; atrás destes, uma reentrância pronunciada; ainda um tanto expandidos arredondam-se para o ápice; margem apical do noto regularmente arredondada; visto de perfil mostra a metade notal proximal fortemente elevada e a distal praticamente plana; o esternito encurva-se para baixo no terço basal e depois inclina-se muito ligeiramente para cima; placa vertical elevada; a pilosidade recumbente densa, e a mais longa, hirsuta, menos densa porém bem conspícua; superfície brilhante, provida de puncturações semelhantes às do mesonoto. II segmento maior em comprimento que o restante do abdomen; na largura máxima mede o dobro do ápice do I segmento; pilosidade bem menos conspícua que a do I segmento, muito pouco brilhante; impuncturado ao redor da base; na zona mais dilatada, uma faixa de puncturações irregularmente dispostas, sendo estas as puncturas mais grossas que se observam nesta espécie; o restante do segmento densamente coberto de fina puncturação cujos intervalos são rugosos. Demais segmentos gradativamente diminuidos em tamanho, de margens providas de puncturação semelhante à da margem do segundo segmento; as puncturas de tamanhos diversos, nítidas e irregularmente dispostas; a densidade da puncturação varia com os indivíduos; pilosidade hirta; o último segmento densamente piloso; aguilhão com 6 farpas.

Coloração: Cabeça negra; extremidade das mandíbulas, bordo inferior do clípeo e bulbos das antenas, ferruginosos ou ferruginoso-enegrecidos; segmentos do flagelo das antenas, inferiormente, salvo os dois primeiros, amarelo-ferruginosos. Maculações amarelas, de tons variáveis (Seguy n.º 325 e 260): diminuta mancha basal na face interna do escapo; clípeo, salvo a margem inferior, as margens látero-superiores estreitamente, e mácula negra central, transversal, de extremidades voltadas para baixo e para dentro; órbitas internas largamente; a mancha amarela liga-se com a que invade inteiramente o vértice; ao lado dos ocelos posteriores pequenas manchas negras alongadas, que se ligam a uma faixa também negra, transversal, posterior aos ocelos e dilatada no meio; genas, menos estreita faixa negra de largura irregular que começa no terço das órbitas externas e mar-

gina os olhos até o ápice; outra faixa negra correndo no bordo externo das genas e do vértice; duas estreitíssimas manchas amarelas transversais, quase contiguas, ao longo da margem superior do occipício; duas pequenas manchas de formato irregular entre as bases das antenas e o clípeo; duas grandes manchas alongadas, que, às vezes ligadas às infra-antenais, nascem junto às antenas, sobem quase ligadas e em seguida divergem sôbre a fronte. Êste é o padrão máximo de xantismo do material estudado. Ha indivíduos em que a maculação negra post-ocelar é mais extensa, prolonga-se para trás até o occipício interrompendo a grande faixa amarela do vértice; nas genas o amarelo reduz-se a duas estreitas manchas alongadas centrais com larga interrupção entre si; nas órbitas internas a orla amarela apenas é consideravel na metade inferior, estreitando-se bastante a partir da incisão ocelar; as manchas centrais inferiores da fronte assumem formato piriforme e desligam-se das sub-antenais; a mancha negra central do clípeo também aumenta de tamanho conservando todavia o mesmo formato; nas antenas o amarelo-ferruginoso inferior aparece somente nos cinco últimos artículos. Tórax negro com as seguintes maculações amarelas: mancha alongada do ângulo ínferoanterior até pouco alem da fosseta pronotal; mancha estreita sôbre a "crista" protorácica; pequena mácula no lóbulo pronotal superior; faixa no bordo pronotal posterior, interrompida no centro, com prolongamentos em direção às "cristas"; mancha alongada paralela à sutura mesopleural; margens dos escutelos, estreitamente; todo o segundo peritrema e bordos do metapostnoto; duas pequenas manchas em crescente aos lados da depressão propodeal; expansões apicais do propódeo. Tégulas ferruginosas com a metade distal amarela; maior parte do esclerito costal. Pernas ferruginoso-escuras com duas manchinhas quase apagadas na extremidade interna das coxas. Ha exemplares em que o amarelo invade quase todo o pronoto para trás das cristas", toda a tégula, quase toda a superfície externa das coxas anteriores; aparecem também manchas rodeando largamente a face externa das coxas medianas e mais estreitamente a das posteriores. Abdomen negro com as seguintes zonas amarelas: faixa marginal, estreita, no primeiro tergito; faixas estreitas marginais nos tergitos e esternitos dos segmentos II a V (no II tergito a faixa prolonga-se lateralmente), quase todo o último segmento. Em certos exemplares, de amarelo mais difundido, ha ainda estreita manchinha aos lados do pecíolo abdominal.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 8 mm; asa anterior 7 mm.

♂ — Cabeça, vista de frente (est. 15, fig. *C*) pouco mais larga que alta, de aspecto ainda mais hirsuto pela densa pilosidade, principalmente a ocular; vista de cima, relativamente mais curta que a da fêmea. Fronte elevada, aos lados do ocelo anterior levantada em gibosidades arredondadas; fina e esparsamente puncturada; pilosidade densa e recumbente até pouco abaixo do ocelo anterior, em linha de um a outro sinus ocular; o restante do fronte até o vértice, provido de pilosidade erecta, esparsa. Vértice fortemente elevado, ultrapassando notavelmente o nível superior dos olhos; cômoro ocelar nitidamente elevado. Olhos cerca de uma vez e meia mais afastados ao nível do ocelo anterior que no clípeo; muito densamente piloso. Genas muito estreitas, pouco mais alargadas inferiormente. Clípeo mais largo que alto, fraca mas uniformemente abaulado, contíguo aos olhos em extensão equivalentes ao III artículo do flagelo; de ápice mais arredondado. Espaço óculomalar estreitíssimo; cuneiforme. Antenas gradativamente engrossadas para a extremidade; XIII artículo pouco mais longo que o antecedente, extremidade em ponta romba.

Protórax com a "crista" mais forte, mais saliente e o ápice cortante voltado para trás. Mesonoto mais densamente piloso e pouco mais densamente puncturado. Escutelo mais fortemente abaulado, mais longo e menos densa e grossamente puncturado. Depressão propodeal mais estreita e de bordos mais nítidos.

Peciolo abdominal com a zona postpeciolar mais abruptamente levantada, com alguma puncturação grossa no ápice; esternito rugoso; II segmento bem mais grosseiramente puncturado, extendendo-se a puncturação até o bordo posterior; segmentos III a VI densamente puncturados; VII impucturado, de ápice arredondado. Genitália representada na est. 15 fig. *D*.

Coloração: do mesmo padrão da fêmea, porém todo o flagelo, inferiormente, amarelo-ferruginoso: o escapo inferiormente amarelo; a mancha das órbitas internas vai somente até o sinus ocular; não existem as manchas sub-antenais; o clípeo é amarelo, salvo as suturas laterais superiores e uma mancha negra basal que emite dois prolongamentos distais até pouco abaixo do meio do clípeo ou reduzem-se a duas manchinhas alongadas, discais; mancha amarela das genas estreitada para cima e terminando antes do ápice dos olhos; manchinha amarelo-ferruginosa ao centro do cômoro ocelar; manchas amarelas em triângulo muito alongado, partindo de junto dos olhos e dirigidas para o centro do vértice, atrás dos ocelos. Nas pernas anteriores a face externa das coxas, uma manchinha distal nos trocânteres, metade distal inferior interna dos fêmures anteriores, amarelos, ápice e face interna das tíbias amarelo-ferruginosos; nas pernas medianas grande extensão da face externa das coxas, metade interna distal dos fêmures amarelos ou amarelo-ferruginosos; nas pernas posteriores pequena extensão da face interna das coxas amarelo-ferruginosa. No abdomen, parte apical do último tergito e quase todo o último esternito, amarelos; no segundo tergito a faixa amarela lateral alarga-se junto à base formando a mancha arredondada de cada lado.

Comprimento: (cabeça + tórax + tergitos I e II) 6,5 mm; asa anterior 7 mm.

F. SMITH, em 1863, descreve uma espécie de *Polybia* que denomina *enxuy*, de acordo com o nome vulgar que a espécie tem no Brasil e cuja significação lhe foi explicada por H. BATES. A descrição, apenas cromática, desta espécie, coincide perfeitamente com *P. sylveirae*. Já em 1898 FOX declara-a parecer idêntica a *sylveirae*. Foi MEADO WALDO, em 1911, que, examinando o tipo, sinonimizou-a, grafando correntamente o nome *enxuy* que aparece deturpado para *enxius* em FOX e DALLA TORRE.

Material examinado: Rio de Janeiro (Itatiaia); Mato Grosso (Salobra; Guaicurús); São Paulo (Novo Horizonte; São Manoel; Rio Claro; Capital).

Distribuição geográfica: BRASIL: Ceará (Baturité); Rio de Janeiro (Itatiaia); Distrito Federal; Minas Gerais (Ponte Nova; Barbacena; Silveira (?); Poços de Caldas); Goiaz (Sta. Rita das Antas); Mato Grosso (Salobra; Guaicurús); São Paulo (Itapura; Novo Horizonte; Franca; São Manoel; Capital; Campos do Jordão; Piquete); Rio Grande do Sul (São Lourenço).

ARGENTINA: Missiones. PARAGUAY: Alto Paraná. Nota: Ha, ou havia, no Brasil, numerosas localidades denominadas Sylveira, Silveira ou Sylveiras, nos Estados de Ceará, Sergipe, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul. SAUSSURE, que deu à espécie o nome toponímico, não especificou o respectivo Estado. IHERING, em 1904, refere-se a Sylveira, Est. de Minas Gerais.

N i n h o : Não nos foi possivel obter ninhos desta espécie; apenas um, de grande tamanho, foi observado em Novo Horizonte, Sp. e achava-se localizado a uns 4 metros de altura, em uma árvore. Muitos galhos atravessavam-no; era de coloração acinzentada e o revestimento externo mostrava protuberâncias irregulares, alongadas, não muito altas. Tratava-se de colônia grandemente populosa e, na ocasião em que tentávamos nos aproximar, tivemos oportunidade de experimentar a agressividade desta espécie. Lançam-se em perseguição do extranho até dezenas de metros longe do ninho. O conhecido expediente de deitar-se para evitar as picadas, não deu resultado nessa oportunidade, pois as vespas voavam rente do chão.

Segundo IHERING, que foi o primeiro a escrever sôbre o ninho (1903), este é "complètment différent de celui des autres espèces de son groupe" (Referia-se a espécies de *Polybia*). Na classificação de SAUSSURE, enquadra-se entre os fragmocítaros retilíneos perfeitos. Nota IHERING que a passagem ao grupo dos fragmocítaros esféricos é bem manifesta. Os primeiros favos são globulares e os demais apenas ligeiramente encurvados. A construção dos alvéolos é irregular, sendo êles começados em grupos isolados. Ha em cada favo um orifício de comunicação interna, mais ou menos central, que, nos diversos favos, nem sempre se correspondem exatamente. Exteriormente notam-se rugosidades e elevações irregulares. O envolucro externo tem a grossura de papel forte. Situam-se nas árvores e são atravessados por galhos que lhes reforçam a estrutura. Um dos ninhos observados por IHERING media 30 cm de comprimento, 15 cm de largura na zona mediana e 25 cm no ápice; o outro, 22 cm de comprimento e 19 de largura. Forma geral esférica, um tanto achatados nos polos. Dimensões das células: 3-3,1 mm de diâmetro por 20 mm de altura inclusive 2-3 mm de tecido sedoso feito pela larva.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE GENUS *PROTONECTARINA* DUCKE, 1910 (HYM.-VESPIDAE)

A b s t r a c t

In this paper the genotype of P r o t o n e c t a r i n a DUCKE, *1910, P. s y l v e i r a e, is studied. References, chiefly according to the literature, are made to the nest.*

Protonectarina sylveirae (SAUSS., 1854)

Fig. *A* — Cabeça da fêmea.

Fig. *B* — Pecíolo abdominal da fêmea.

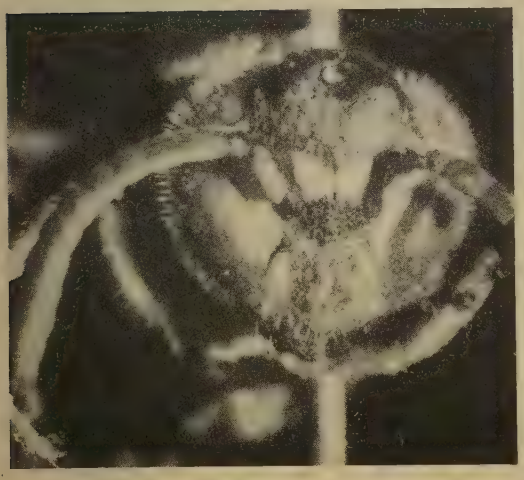


Fig. *C* — Cabeça do macho.

Fig. *D* — Genitália do macho.

Vol. 17 — Art. 15 Dezembro de 1946

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ENTERITE INFECCIOSA DOS BEZERROS

I. IMPORTANCIA DA "SALMONELLA DUBLIN" NA ETIOLOGIA DESSA MOLESTIA EM SÃO PAULO

POR

A. M. Penha e M. D'Apice

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 16-17

INTRODUÇÃO

A enterite infecciosa dos bezerros, doença muito difundida em quase todos os paizes do mundo, é causa de enormes prejuizos à pecuaria. Sua etiologia começou a ser esclarecida na ultima decada do seculo passado pelos trabalhos classicos de JENSEN, na Dinamarca, e POELS, na Holanda, confirmados no começo deste seculo por varios pesquizadores alemães, que mostraram a importancia do papel desempenhado pelo *Bacterium coli* no aparecimento da molestia. Fato identico verifica-se tambem nos Estados Unidos, onde o *"Calf Scours"* está frequentemente associado a uma septicemia coli.

Pouco depois de seus trabalhos fundamentais, POELS e JENSEN, citados por KARSTEN (1921), descreveram contudo, sob as denominações de "Pseudocolibacillose" e "Paracolibacillose", modalidades infecciosas da *"Kälberruhr"*, cujos germes se assemelhavam morfologicamente ao *Bact. coli*, mas diferiam dele por algumas propriedades culturais, tais como incapacidade de coagular o leite e de fermentar a lactose. THOMASSEN (1897) já havia isolado anteriormente, de "Uma nova septicemia dos bezerros com nefrite e urocistite consecutivas", um germe semelhante, aglutinavel parcialmente pelo sôro tifico, que DE NOBELE demonstrou pouco depois pertencer ao grupo GAERTNER. Em 1909 WIEMANN verificou que esse tipo de infecção ocorria tambem na Alemanha, tendo demonstrado pela prova de aglutinação a identidade dos germes por ele isolados, com o "bacilo paracoli" de JENSEN e o *Bact. enteritidis* GAERTNER.

Trabalhos posteriores de diversos pesquizadores ampliaram o ambito de ocorrencia dessa infecção na Europa e esclareceram diversas particularidades de sua etiopatogenia; mas a posição sistematica de seu agente causador só pôde ser precisada depois dos trabalhos de WHITE e de KAUFFMANN no genero *Salmonella*. SMITH e SCOTT

(1930), estudando diversas culturas dinamarquesas do "bacilo paracoli", demonstraram, pela prova de saturação de aglutininas, que esse germe pertencia ao tipo "Dublin", de WHITE (1929), para o qual WARREN e SCOTT (1929) haviam proposto a denominação de *Salmonella dublin*. Esta, porém, só foi definitivamente adotada em 1939 pelo Subcomité de Salmonellas, no Terceiro Congresso Internacional de Microbiologia de New York. Corresponde à *S. enteritidis* var. *dublin* do primitivo esquema KAUFFMANN-WHITE e ao tipo "Kiel" ou "Dublin-Kiel" de KAUFFMANN.

OCORRENCIA

As estatisticas publicadas por MIESSNER e WETZEL (1929) mostram que esse germe é responsavel, aproximadamente, por 10 a 15% dos casos de molestias infecciosas dos bezerros na Alemanha. Quanto aos outros paizes europeus não ha estatisticas tão minuciosas; sabe-se, todavia, que a infecção existe, tendo sido estudada por BOSWORTH e LOVELL (1931), na Inglaterra, e STROZZI (1934), na Italia. Nos Estados Unidos ela foi encontrada por MEYER, TRAUM e ROADHOUSE (1916), na California, sendo desconhecida nos estados do centro e do leste. Foi verificada tambem na India por SHIRLAW (1935) e na Australia por STEWART e HAYSTON (1941). É porém nos paizes tropicais que sua ocorrencia parece mais frequente. Foi minuciosamente estudada, do ponto de vista cultural e sorologico, por HENNING (1939), na Africa do Sul; na America do Sul, foi identificada por GALLO (1939), na Venezuela, e GUERRERO (1943), no Equador, bem como por LERENA (1943 e 1946), na Argentina, que contudo não entrou em detalhes bacteriologicos.

No Brasil, dada a importancia de que se reveste a enterite infecciosa dos bezerros entre nós, o problema tem sido objeto de nossa preocupação desde 1928, quando foi criada a Divisão Animal do Instituto Biologico. As numerosas observações verificadas nesse periodo permitiram-nos formar uma idéia bem aproximada acerca dos agentes infectuosos geralmente em causa, e dos metodos de combate mais aconselhaveis. Nossos estudos sobre o assunto relacionaram-se de preferencia, primeiro, com a natureza etiologica da doença, depois, com o mecanismo de transmissão dos anticorpos da mãe ao filho e, por ultimo, com o dificil problema da vacinação dos bezerros. Na primeira parte deste trabalho limitamos-nos ao problema etiologico, deixando o restante para a segunda parte.

SINTOMAS E LESÕES

Os sintomas mais caracteristicos da doença são tristeza e diarréia. A infecção pode ocorrer nos primeiros dias de idade do bezerro, mas é mais frequente da segunda semana em diante. Manifesta-se inicialmente pela perda do apetite, acompanhada logo depois de sonolencia, lacrimejamento, depressão e fraqueza. A temperatura é elevada, 40 a 41°C., e os pêlos tornam-se arrepiados e sem brilho. Os animais permanecem deitados, levantando-se com dificuldade. Em seguida sobrevem a diarréia, catarral a principio, depois francamente mucosa, profusa e sanguinolenta, acompanhada de tenesmo. As fézes escorrem pelas partes posteriores do bezerro, provocando irritação da pele e formação de áreas depiladas, avermelhadas. Podem sobrevir complicações pulmonares, que se manifestam pela respiração acelerada e ruidosa, acompanhada de tosse.

A mortalidade é elevada e os bezerros que conseguem sobreviver mostram-se atrasados e doentios, e de manutenção antieconomica. As alterações anatomicas, quase sempre pouco caracteristicas, revelam em geral o quadro de uma septicemia: petéquias nas serosas e mucosas, e hemorragias subcapsulares nos rins e no baço, que se apresenta geralmente aumentado. Intestino delgado fortemente congestionado; conteúdo liquido e sanguinolento. Ganglios linfaticos mesentericos aumentados de tamanho e suculentos ao corte. Figado com pequenos fócos acinzentados, de necrose.

MATERIAL ESTUDADO

O material para exame bacteriologico consistia inicialmente de fezes e de fragmentos de diversos orgãos colhidos em necropsia. Quando se tornou rotina o envio do osso da canela para diagnostico de laboratorio, passamos a examinar apenas a medula ossea de um dos metacarpianos do bezerro. Uma vez ou outra, examinavamos tambem fragmentos de orgãos conservados em glicerina fosfatada (meio de Bedson).

No laboratorio, o osso da canela era serrado na porção mediana, semeando-se em seguida a medula ossea, asseticamente, em placas de agar sangue e de Teague, bem como em tubos de caldo simples e em meio de Tarozzi, incubando-se a 37°C. No dia seguinte as placas eram examinadas e as colonias suspeitas aglutinadas em lamina pelo sôro especifico do tipo "Dublin". Caso não fossem encontradas colonias suspeitas, as culturas em caldo e em Tarozzi eram passadas tambem em placas e inoculadas em cobaia, para isolamento de germes e

verificação do poder patogenico. As colonias isoladas eram submetidas depois às provas bioquimicas e sorologicas necessarias para identificação completa do germe.

Desde o começo chamou-nos a atenção a elevada frequencia com que isolavamos salmonelas desse material. A relação seguinte, organizada apenas com material examinado no periodo de 1940 a 1944, dá desse fato uma idéia bem nitida: *Salmonella* — 54; *Proteus* — 29; *Bacterium coli* — 17; Cocos — 4; Negativo — 65; Total — 169. (PENHA e D'APICE, 1944).

ESTUDO BACTERIOLOGICO

O estudo sistematico das salmonelas isoladas, unico germe que nos interessa neste trabalho, revelou, com raras exceções, que se tratava de *Salmonella dublin.*

Propriedades morfologicas e culturais — Foram estudadas em conjunto 51 amostras diferentes. O exame microscópico revelou bastonetes irregulares, francamente moveis, Gram-negativos, não capsulados nem esporulados. No caldo simples observou-se turvação do meio dentro de 24 horas de incubação a 37°C.; frequentemente havia formação de pelicula e de pequeno deposito no fundo do tubo, alguns dias depois. No meio de Tarozzi (coberto de vaselina solida): crescimento abundante, com turvação do liquido e produção de gas. No agar sangue (placa): colonias arredondadas, convexas, lisas, de bordos regulares, medindo 1 a 3 mm de diametro, com 24 horas de incubação a 37°C.; ausencia de hemolise. No meio de Teague (agar eosina azul de metileno): colonias transparentes, de morfologia e tamanho identicos às anteriores; às vezes, formação de anel mucoso.

Propriedades bioquimicas — As leituras eram feitas com 24 horas de incubação a 37°C., prolongando-se as observações até 30 dias para os tubos negativos. Todas as 51 amostras fermentaram a glicose em tubo Dunham, com produção de gas. Fermentaram tambem: maltose, dulcita e xilose. Não fermentaram: lactose, sacarose e salicina. Na arabinose, 40 amostras foram negativas e 11 fermentaram-na tardiamente. Ramnose segundo Bitter: 49 negativas e 2 positivas. Dextro-tartarato: 49 negativas e 2 positivas. Produção de hidrogenio sulfurado positiva. Leite tornasolado: acidificação fraca inicial seguida dentro de poucos dias de alcalinização progressiva e formação de pequeno deposito esbranquiçado de redução. Produção de indol negativa.

PROVAS SOROLOGICAS

Estas provas foram executadas com sôros provenientes do Instituto Robert Koch, de Berlin, e outros especialmente preparados por nós para esse fim. A técnica adotada obedeceu em suas linhas gerais à descrita por BOECKER e KAUFFMANN (1931). As culturas testemunhas, que serviram de controle em algumas provas, provêm tambem do Instituto Robert Koch e fazem parte de nossa coleção de salmonelas.

A identificação sorologica preliminar consistia, como dissemos, em provas de aglutinação rapida, feitas em lamina, com sôro especifico "Gaertner-Kiel" diluido a 1 para 100; de 51 amostras de salmonelas de bezerro provadas, 49 foram aglutinadas por esse sôro. A mesma prova, realizada com sôro inespecifico "Suipestifer", deu, ao contrario, resultado negativo, mostrando assim que as 49 amostras dotadas de fatores especificos do tipo "Dublin" eram desprovidas de fatores inespecificos, fato que simplificava bastante o prosseguimento da identificação sorologica.

Para classificação no grupo somatico, foram escolhidas seis amostras diferentes, isoladas em epocas e logares bem distintos. Eram semeadas em tubo de agar inclinado, incubadas 24 horas a 37°C., emulsionadas em agua fisiologica e aquecidas meia hora a 100°C. Os resultados obtidos das aglutinações constam do quadro I. A amostra "Kiel" 641 é uma *Salmonella dublin*, incluida nas diversas provas como testemunha. As seis amostras provadas foram aglutinadas pelo sôro tifico até 1:200 ou mesmo 1:800, não o sendo, ou quando muito apenas a 1:100, pelos demais; pertencem, portanto, ao grupo somatico D.

QUADRO I

Titulos de aglutinação somatica com sôros representativos de cada grupo de Salmonella

Germes (Antigeno "O")	Paratyphus A (Grupo A)	Paratyphus B (Grupo B)	Suipestifer (Grupo C)	Typhus (Grupo D)	London (Grupo E)
B 14	0	0	0	800	100
Bez 118	100	0	0	800	100
6664	0	0	0	200	100
6924	100	0	0	400	0
7657	100	0	0	200	0
M. D.	100	0	0	400	0
Kiel 641	100	0	0	800	100

0 = titulo inferior a 100. Não foram feitas aglutinações mais baixas.

Para prova cruzada de saturação de aglutininas, foi escolhida a amostra 6924, tendo-se, para esse fim, preparado em coelhos um sôro aglutinante pela tecnica usual de inoculações intravenosas de quantidades crescentes de germes mortos por aquecimento a 57°C., durante meia hora, começando-se por emulsões ligeiramente opalecentes. As doses a injetar eram preparadas no dia da inoculação, emulsionando-se em agua fisiologica uma cultura em agar inclinado incubada 24 horas a 37°C., a qual depois de convenientemente diluida, era morta pelo calor. Foram feitas cinco inoculações com intervalos de cinco dias e os coelhos sangrados a branco dez dias depois da ultima injeção.

Os antigenos empregados para absorção de aglutininas foram feitos em garrafas de Kolle com agar de preparação recente. Depois de 24 horas de incubação a 37°C., o induto microbiano de cada garrafa era emulsionado em 5 cc de agua fisiologica, para se obter emulsão bem espessa. Misturavam-se em seguida 7,35 cc dessa emulsão com 0,15 cc do sôro a ser absorvido. Deixava-se duas horas a 37°C. e depois 24 horas em temperatura ambiente. Centrifugava-se a 3000 r.p.m. durante duas horas e decantava-se em seguida.

Foram feitas de inicio tres absorções: sôro "Kiel" pelo germe 6924, sôro 6924 pelo germe "Kiel" 641 e sôro "Kiel" pelo germe "Jena" 639. As aglutinações flagelares realizadas antes e depois da absorção com emulsões desses mesmos germes, aquecidas meia hora a 60°C., constam do quadro II.

QUADRO II

Titulos das aglutinações flagelares antes e depois das absorções

Germes (Antigeno "H")	Sôro "Kiel" antes da absorção	Sôro "Kiel" absorvido por 6924	Sôro 6924 antes da absorção	Sôro 6924 absorvido por "Kiel" 641	Sôro "Kiel" absorvido por "Jena" 639
Jena 639	3200	—	6400	—	0
Kiel 641	12800	6400	25600	0	3200
6924	6400	0	12800	0	1600

0 = titulo inferior a 100

Antes da absorção, os sôros "Kiel" e 6924 aglutinaram os germes "Kiel" 641 e 6924 com titulos elevados, mas deixaram de faze-lo depois de absorvidos. A amostra 6924 tem, portanto, fatores especificos identicos ao germe "Kiel" 641, e não possue outros.

A aglutinação do germe "Kiel" 641 pelo sôro "Kiel" absorvido por 6924 sugeria contudo certa deficiencia de fatores deste ultimo em relação a "Kiel" 641, tendo sido, por isso, repetida a prova em outras condições. Para esse fim foram preparados em coelhos, pela mesma tecnica acima descrita, mais tres sôros: "Kiel" 641, 7657 e Bez 118. As provas de aglutinações somatica e flagelar constam dos quadros III e IV.

QUADRO III

Titulos das aglutinações somaticas

Germes (Antigeno "O")	Sôro "Kiel" 641	Sôro 6924	Sôro 7657	Sôro Bez 118
Kiel 641	800	800	1600	800
6924	200	800	1600	200
7657	400	400	800	800
Bez 118	800	800	1600	800

Elas confirmam que o germe 6924 parece pobre ou mesmo deficiente em alguns fatores; mas os dois outros, 7657 e Bez 118, esgotaram completamente o sôro "Kiel" 641, e seus sôros foram, por outro lado, esgotados pelo germe "Kiel" 641; são, portanto, sôrologicamente identicos a este germe.

QUADRO IV

Titulos das aglutinações flagelares antes e depois das absorções de aglutininas

Germes (Antigeno "H")	Sôro "Kiel" 641				Sôro 6924		Sôro 7657		Sôro Bez 118	
	Não absorvido	Absorvido por 6924	Absorvido por 7657	Absorvido por Bez 118	Não absorvido	Absorvido por "Kiel" 641	Não absorvido	Absorvido por "Kiel" 641	Não absorvido	Absorvido por "Kiel" 641
Kiel 641	6400	200	0	0	25600	0	51200	0	102400	0
6924	12800	0	0	0	51200	0	51200	0	51200	0
7657	6400	400	0	0	6400	0	25600	0	51200	0
Bez 118	12800	800	0	0	25600	0	102400	0	51200	0

0 = titulo inferior a 200

O sôro "Kiel" absorvido pelo germe "Jena" dá-nos o sôro fator especifico *p*, que deixa de aglutinar o proprio "Jena", mas continua aglutinando os germes portadores do fator *p*. Esse sôro presta-se, portanto, para identificar as salmonelas dotadas desse fator, pela prova rapida de aglutinação em lamina e, por esse motivo, foi ela executada com todas as nossas salmonelas isoladas de bezerro, com sôro diluido a 1:100, tendo sido positiva para as 49 amostras que haviam sido aglutinadas anteriormente pelo sôro "Kiel" não absorvido. Foram tambem aglutinados: "Kiel" 641 e "Rostock" 642; deixaram de se-lo, como era de esperar, "Jena" 639, "Ratin" 640, "Moscow" 643, "Senftenberg" 617 e "Derby" 623, que têm o fator *g*, mas são desprovidos de *p*. (*)

Em resumo, 49 das 51 amostras de salmonelas isoladas de bezerro têm fatores especificos do tipo "Dublin", e são desprovidas de fatores inespecificos. As provas de aglutinação somatica, realizadas em seis delas, colocam-nas no grupo D. Alem disso, as provas de saturação de aglutininas, procedidas com as amostras 6924, 7657 e Bez 118, permitem classifica-las no proprio tipo "Dublin". Finalmente, essas 49 amostras de salmonelas de bezerro, passadas em sôro aglutinante para o fator *p*, obtido por absorção, mostraram-se portadoras desse fator, comum aos tipos "Dublin" e "Rostock", mas diferenciam-se deste ultimo pelas propriedades bioquimicas (comportamento na arabinose).

Depois de realizadas essas provas, já tivemos oportunidade de identificar pela prova de aglutinação rapida em lamina, feita com sôros "Kiel" e fator especifico *p*, mais 29 novas culturas, o que perfaz o total de 78 amostras de *Salmonella dublin* identificadas aqui na enterite infecciosa dos bezerros.

RESUMO E CONCLUSÕES

A enterite infecciosa dos bezerros é molestia muito frequente no Brasil; mas, ao contrario do que se verifica na Europa e nos Estados Unidos, onde o *Bacterium coli* desempenha o papel mais saliente, entre nós, como em outros países tropicais, é a infecção por *Salmonella* que predomina.

A principal fonte de material para o estudo bacteriologico apresentado era o osso metacarpiano do bezerro morto. Foram examinadas 80 culturas de *Salmonella:* a analise sôrologica por satura-

(*) Por gentileza do Dr. C. A. Peluffo de Montevidéo, a quem agradecemos, as amostras 6924 e 7657 foram passadas em sôros tipo-especifico preparados por ele no Instituto Butantan. Ambas têm os fatores gp do tipo "Dublin" e são desprovidas de fator u do tipo "Rostock". Agradecemos tambem ao Dr. Paulo C. Nobrega, do Instituto Biologico de São Paulo, as numerosas sugestões a respeito da identificação sorologica consignada neste trabalho.

ção de aglutininas procedida em tres delas demonstrou que se tratava do tipo "Dublin". As restantes foram classificadas no mesmo tipo pela prova rapida de aglutinação em lamina com sôros "Kiel" e fator especifico *p*, suplementada pelas provas culturais e bioquimicas. Apenas duas não se comportaram como tipo "Dublin".

STUDIES ON INFECTIOUS DIARRHEA OF CALVES.

I — THE IMPORTANCE OF "SALMONELLA DUBLIN" AS A CAUSE OF THAT DISEASE IN THE STATE OF S. PAULO

Abstract

Infectious diarrhea of calves is a very common disease in Brazil, but whilst in Europe and in the United States it is mainly caused by Bacterium coli, in Brazil, at least in the State of São Paulo, as well as in other tropical countries, the infection is predominantly caused by Salmonella.

The main source of material for the bacteriological study given in this paper was a cannon bone of the dead calf. Eighty different strains of Salmonella were examined as to their cultural and serological reactions. Three of them were proved to be of the Dublin type by crossed agglutinin-absorption tests; the majority of the remaining cultures were classified within the same type by rapid macroscopic agglutination tests and fermentation reactions.

The rapid agglutination tests were made on a glass plate mixing a loopful of the agar culture to be examined in a drop of Dublin antiserum or of specific antigen p *antiserum. Only two cultures were not of the Dublin type.*

BIBLIOGRAFIA

ANÔNIMO — 1934 — The Genus Salmonella Lignières, 1900. Issued by the Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology. *Jour. Hyg.*, 34: 333-350.

ANÔNIMO — 1940 — Report of the Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Association of Microbiologists on the Genus Salmonella. *Rep. Proc. Third Intern. Cong. for Microbiol.*, pp. 832-840.

BOECKER, E. und F. KAUFFMANN — 1931 — *Bakteriologische Diagnostik.* Julius Springer, Berlin. Cf. pp. 44-49.

BOSWORTH, T. J. and R. LOVELL — 1931 — The Dublin Type of Salmonella as a Cause of Disease in Calves. *2nd. Rep. Univ. of Cambridge Inst. of Animal Path.*, pp. 21-27.

EDWARDS, P. R. and D. W. BRUNER — 1943 — The Occurence and Distribution of Salmonella Types in the United States. *Jour. Inf. Dis.*, 72: 58-67.

GALLO, P. — 1939 — La paratifosis de los terneros en Venezuela. *Rev. Med. Vet. Parasit.*, Caracas, 1: 34-39.

GUERRERO, R. PLATA — 1943 — Salmonellosis of Calves in Tropical Countries. *Jour. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **103**: 152-154.

HENNING, M. H. — 1939 — The Antigenic Structure of Salmonellas Obtained From Domestic Animals and Birds in South Africa. *Onderstepoort Jour. of Vet. Sc.*, **13**: 79-189.

KARSTEN, FR. — 1921 — *Der Paratyphus der Kälber.* Richard Schoetz, Berlin, pp. 1-109.

LERENA, E. A. — 1943 — Reseña sobre la neumo-enteritis de los terneros en la Argentina. *Rev. Zootecnica*, **30**: 30-36.

LERENA, E. A. — 1946 — Apuntis estadisticos sobre neumoenteritis de los terneros. *Rev. Zootecnica*, **33**: 13-24.

MEYER, K. F., J. TRAUM and C. L. ROADHOUSE — 1916 — The Bacillus enteritidis as the Cause of Infectious Diarrhoea in Calves. *Jour. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **49**: 17-35.

MIESSNER, H. und R. WETZEL — 1929 — Infektiöse Aufzuchtkrankheiten. *In* KOLLE, KRAUS, UHLENHUT: *Hand. Pathog. Mikroor.*, **6** (1): 605-650.

PENHA, A. M. e M. D'APICE — 1944 — Observações sobre a enterite infectuosa dos bezerros. Etiologia e vacinação. *Bol. Soc. Paul. Med. Vet.*, **6** (2): 154-160.

SHIRLAW, J. F. — 1935 — Pyosepticemia of Calves. *Indian Jour. Vet. Sc. and An. Husb.*, **5**: 232-250.

SMITH, J. and W. M. SCOTT — 1930 — Continued Fever Due to a Gärtner-Like Salmonella of the Type "Dublin". *Jour. Hyg.*, **30**: 32-39.

STEWART, D. F. and J. T. HAYSTON — 1941 — Salmonella dublin Infection in Calves *Australian Vet. Jour.*, **17**: 102-104.

STROZZI, P. — 1934 — Il paratifo dei vitelli in Italia. *Cl. Vet.*, **57**: 337-354.

THOMASSEN, M. — 1897 — Une nouvelle septicémie des veaux avec néphrite et urocystite (bactériurie) consécutives. *An. Inst. Pasteur*, **11**: 523-540.

WARREN, S. H. and W. M. SCOTT — 1929 — A New Serological Type of Salmonella. *Jour. Hyg.*, **29**: 415-417.

WHITE, P. BRUCE — 1929 — Notes on Organims Serologically Related to S. enteritidis Gärtner. I. The Dublin and Tokyo Types of Salmonella. *Jour. Hyg.*, **29**: 443-445.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 16

Fig. *A* — Lote de bezerros atacados de infecção paratifica. Nesta criação, mais de 70% da bezerrada já havia morrido em consequencia dessa moléstia.

Fig. *B* — Atitude característica do bezerro com paratifo. Observe-se a região peri-anal suja, em consequencia da diarréia que se manifesta frequentemente nessa infecção.

Estampa 17

Fig. *C* — Bezerro com paratifo, em estado pre-agonico.

Fig. *D* — O mesmo animal fotografado de frente.

A
B

C

D

Vol. 17 — Art. 16 Dezembro de 1946

TOXIDÊS DOS CONSTITUINTES DAS SEMENTES DE "PACHYRRHIZUS TUBEROSUS (LAM.) SPRENG." VAR. VERMELHA, PARA O AFÍDEO "BREVICORYNE BRASSICAE L." HOMOPTERA-APHIDIDAE)

POR

H. S. Lepage, O. Giannotti e A. Orlando

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 18-21

I — INTRODUÇÃO

As substancias inseticidas de origem vegetal, embora muitas vezes economicamente inferiores quando confrontadas com os principios inseto-tóxicos minerais e organicos sinteticos, são, em determinados casos, de eficiencia comparavel ou mesmo superior á desses produtos, sendo mesmo algumas, presentemente, as preferidas principalmente para fins orticolas, devido á sua relativa inocuidade ao homem.

Entre os derivados de plantas já universalmente empregados como inseticidas destacam-se, pelo seu largo uso em agricultura, as piretrinas, a rotenona e a nicotina.

Em nossos ensáios procuramos justamente estudar, do ponto de vista toxicológico, uma leguminosa, cujas sementes são conhecidas como dotadas de uma porcentagem relativamente alta de rotenona e de outras substancias inseticidas, ao que reune as vantagens de ter ciclo anual, ser de facil cultivo, de ótimo desenvolvimento e, ainda, uma alta produção de tuberculos, já recomendados para alimentação humana e de animais desde os meiados do século 17. (Estampas 18-19, figs. *A-C*). É sabido que ordinariamente essas qualidades não se acham reunidas em outras plantas dotadas de rotenona, principalmente as dos generos *Lonchocarpus* e *Derris*, apezar destas apresentarem um teor de principios ativos bem mais elevados.

A leguminosa a que nos referimos pertence ao gênero *Pachyrrhizus*, o qual compreende diversas espécies bem diferenciadas, todas de otima produção de sementes e tuberculos e apresentando pequenas flutuações em suas principais qualidades. (4, 1944).

A espécie por nós utilizada nesses ensáios toxicológicos foi a *Pachyrrhizus tuberosus* (LAM.) SPRENG. var. vermelha (1) (Jacatupé).

(1) Determinação realizada pelo Snr. F. C. HOEHNE, do Departamento de Botanica da Secretaria da Agricultura de São Paulo, a quem gentilmente agradecemos.

As sementes foram conseguidas por uma primeira cultura de multiplicação, realizada no Campo Experimental de Ibirapuéra (Instituto Biológico) e com a qual obtivemos para a variedade em questão, de um total de 218 pés plantados, 41 quilos de sementes (Est. 19, fig. *D*) e 270 quilos de tuberculos, o que veio mais uma vês demonstrar o ótimo desenvolvimento da planta entre nós.

Ainda nos atuais ensáios e com o fim de torna-los mais completos, procuramos comparar a eficiencia demonstrada pelos extratos de sementes de Jacatupé var. vermelha, como inseticida, com a de um produto comercial existente em nosso meio e que, alem de outras substancias, tem tambem uma porcentagem elevada de rotenona, principio que até certo ponto coincide com o encontrado nas sementes da leguminosa em estudo.

II — LITERATURA

Neste paragrafo procuramos apontar sómente os trabalhos que se referem ao valor das sementes de plantas do gênero *Pachyrrhizus* como inseticida e assim o fazemos por ser esse o aspecto a que estão relacionados os estudos toxicológicos que ora realizamos.

As referências bibliograficas relativas a plantas do gênero *Pachyrrhizus* são numerosas, pois como já notamos, os tuberculos produzidos por esses vegetais são conhecidos e mesmo utilizados na alimentação humana e de animais, ha vários séculos. Entretanto as constatações das propriedades inseticidas e piscicidas das sementes de plantas do gênero, que sem duvida a tornaram de valor ainda mais apreciavel, são relativamente recentes e registradas com menor frequencia.

Assim, sómente em 1890 é que GRESHOFF (6) isolou, pela primeira vês, das sementes, uma substancia resinosa, a que chamou "pachyrrhizid", em analogia com a "derrid" das raizes de *Derris*, planta que, como é sabido, tem alto teor de principio inseticida.

Mais tarde, VAN SILLEVOLDT (17, 1899) confirmou a descoberta de GRESHOFF, pois conseguiu extrair das sementes a mesma "pachyrrhizid' em forma de resina, além de isolar três outros compostos cristalisados, a cuja natureza e propriedades não encontramos referências.

HUART (8, 1902) já menciona o uso do extrato das sementes no contróle de insetos, referindo-se ao *Capitis pediculus* que parasita o couro cabeludo, e sugere que talvês possa ser empregado o referido extrato tambem para combater as espécies de "piolhos" que molestam o gado vacum.

Em 1907 e 1910, ALTIMIRANO, *et al.* (1) e BOORSMA (3) discutem a toxidês das raizes e sementes, quanto a peixes, cães e outros vertebrados, tendo BOORSMA (3) dado ao principio tóxico a mesma denominação "pachyrrhizid", de GRESHOFF.

Com o acrescimo das novas qualidades, oriundas das constatações já referidas, as plantas do genero *Pachyrrhizus* tornaram-se de valor mais consideravel e mais amplamente conhecidas, tendo PECKOLT (15, 1927) no Brasil elaborado uma interessante monografia sôbre o assunto, onde se evidenciam as propriedades gerais dessas plantas e se propõe o seu cultivo como economicamente dignas de maiores atenções.

Dessa maneira, tambem novos e mais detalhados estudos sôbre a composição das sementes foram aparecendo.

Assim, NAG, *et al.* (11, 1935-36) já consideravam, segundo os estudos efetuados, que o principio tóxico contido nas sementes deveria ser uma "saponina", e HWANG (9, 1941) demonstrou qualitativamente a existencia de rotenona, resultado que pouco mais tarde foi definitivamente confirmado por NORTON (12, 1943), que conseguiu isolar a rotenona pura das sementes de *P. erosus*. Quanto á composição e natureza dos principios tóxicos contidos nas sementes de *Pachyrrhizus* spp., queremos ainda destacar os resultados obtidos por NORTON, (13, 1945), que num trabalho exaustivo e bem orientado conseguiu extrair das sementes dessas plantas seis diferentes compostos de estrutura rotenoide e três frações heterogêneas diversas, algumas das quais verificou serem tóxicas ao *Bombyx mori* (L.) e *Epilachna varivestis* MULS.

Concomitantemente, estudos toxicológicos propriamente ditos foram realizados, continuando entretanto a ser esse um dos aspectos menos conhecido.

Nesse sentido podemos aqui ressaltar os trabalhos de LIU e HSU (10, 1943) que demonstraram serem as pulverizações de extrato obtidos de sementes de *P. erosus* altamente eficientes contra afídeos e outros insetos, e os estudos de HANSBERRY e LEE (7, 1943) que determinaram ser a eficiencia de uma suspensão de sementes moidas, em agua, comparavel á de uma amostra de "Cubé", correspondente, verificando ainda que aquela suspensão tem atividade tambem como inseticida de ingestão contra o *Bombyx mori* e *Epilachna varivestis*.

Finalmente, ainda quanto a esse aspecto, queremos referir-nos aos estudos realizados por LEE e HANSBERRY (16, 1943), os mais completos no assunto e que testando 35 espécies de plantas chinesas

contra o *Bombyx mori*, *Aphis rumicis* e *Epilachna varivestis* concluiram ser o *Pachyrrhizus erosus* a planta que maiores possibilidades oferece.

III — MATERIAL E TÉCNICA

O material utilizado para as pulverizações foi o seguinte: *a*) oleo de sementes de *Pachyrrhizus tuberosus*, vulgarmente denominado Jacatupé, variedade vermelha, extraido por compressão em prensa mecanica, dando um rendimento

TABELA 1

Mortalidade dos afídeos *Brevicoryne brassicae* L. pulverizados com extrato etéreo de *Pachyrrhizus tuberosus* (LAM.) SPRENG., var. vermelha

	N.º de insetos	Concentração	cm3 de extrato por litro de emulsão	N.º de insetos mortos depois de 48 horas	Porcentagem de mortalidade depois de 48 horas
SÉRIE — 1	37	1/4.000	0,25	8	21,6
	60	1/2.800	0,36	20	33,3
	45	1/2.000	0,50	18	40,0
	48	1/1.300	0,77	31	64,5
	47	1/900	1,11	43	91,4
	42	1/600	1,67	41	97,6
"Test."-agua	41	—	—	10	24,3
Sulforicinoleato de sodio	48	1/400	2,50	3	6,2
SÉRIE — 2	31	1/4.000	0,25	10	32,2
	42	1/2.800	0,36	17	40,0
	53	1/2.000	0,50	20	37,7
	48	1/1.300	0,77	30	62,5
	43	1/900	1,11	38	88,3
	42	1/600	1,67	40	95,2
"Test."-agua	34	—	—	3	8,8
Sulforicinoleato de sodio	38	1/400	2,50	5	13,1

TABELA 2

Mortalidade dos afídeos *Brevicoryne brassicae* L. pulverizados com oleo de *Pachyrrhizus tuberosus* (LAM.) SPRENG., var. vermelha extraido por compressão

	N.° de insetos	Concentração	cm3 de extrato por litro de emulsão	N.° de insetos mortos depois de 48 horas	Porcentagem de mortalidade depois de 48 horas
SÉRIE — 1	52	1/1.300	0,77	6	11,5
	53	1/900	1,11	14	26,4
	56	1/600	1,67	27	48,2
	53	1/400	2,50	44	83,0
	57	1/200	5,00	52	91,2
"Test."-agua	45	—	—	5	11,1
Sulforicinoleato de sodio	44	1/400	2,50	6	13,6
SÉRIE — 2	39	1/1.300	0,77	8	20,5
	46	1/900	1,11	11	23,9
	42	1/600	1,67	25	59,5
	49	1/400	2,50	37	75,5
	57	1/200	5,00	53	92,4
"Test."-agua	47	—	—	2	4,2
Sulforicinoleato de sodio	48	1/400	2,50	5	10,4

de 11,5% — Teste qualitativo de DURHAM fracamente positivo. *b*) Extrato etéreo de sementes da mesma origem, obtido em aparelho de Soxhlet, com um rendimento de 25%. Tempo de extracção, 24 horas. Teste qualitativo de DURHAM, positivo. (2) *c*) Amostra comercial de "Timboril", a base de extrato de raizes de *Lonchocarpus* sp., contendo 5,39% de rotenoides e 0,93% de peretrinas.

Para as aplicações, os extratos *a* e *b* foram emulsionados em agua adicionando-se-lhes Sulforicinoleáto de sódio, na proporção de 1:2, respectivamente, e empregado nas diluições consignadas nas tabelas 1 e 2. O material *c* foi usado de

(2) Agradecemos ao quimico industrial Sr. TÉDDY MORAIS o auxilio no preparo dos extratos.

TABELA 3

Mortalidade dos afídeos *Brevicoryne brassicae* L. pulverizados com "Timboril"

	N.º de insetos	Concentração	cm3 de extrato por litro de emulsão	N.º de insetos mortos depois de 48 horas	Porcentagem de mortalidade depois de 48 horas
SÉRIE — 1	51	1/7.800	0,13	5	9,8
	50	1/5.600	0,18	13	26,0
	39	1/4.000	0,25	26	66,0
	50	1/2.800	0,36	40	80,0
	52	1/2.000	0,50	49	94,1
	68	1/1.300	0,77	66	97,0
"Test."-agua	48	—	—	4	8,3
SÉRIE — 2	43	1/7.800	0,13	8	18,6
	35	1/5.600	0,18	18	51,4
	40	1/4.000	0,25	24	60,0
	41	1/2.800	0,36	33	80,4
	57	1/2.000	0,50	52	91,2
	61	1/1.300	0,77	59	96,7
"Test."-agua	47	—	—	8	17,0

acôrdo com as indicações dos fabricantes, isto é, emulsionado em agua pela adição de oleo de pinho, tambem na proporção de 1:2, e aplicado nas diluições constantes na tabela 3. *d*) Sulforicinoleáto de sódio, na diluição de 1:400, afim de verificar sua atividade isoladamente. *e*) Agua, como controladora da viabilidade da técnica e da mortalidade natural dos afídeos nas condições das experiências.

Esses tratamentos foram repetidos, correspondendo ás series 1 e 2 das tabelas 1, e 2 e 3.

As pulverizações foram executadas por meio de uma torre de pulverização, adatada em parte á descrição dada por O'Kane (14, 1943), e que se acha ilustrada na estampa 20, fig. *E*. Com tal dispositivo conseguimos aplicar os inseticidas com um erro de 8 a 10% entre as repetições, considerando-se o deposito total sobre uma caixa de Petri de 8,2 cm de diametro.

A referida torre foi préviamente calibrada com agua para produzir um depósito de cerca de 250 mmgr em uma área de 52,8 cm². Essa condição foi conseguida pela pulverização de 5 cc de liquido a uma pressão constante de 7 lb (válvula reguladora de pressão) e com um tempo de espéra de 30 segundos após o exgotamento do liquído a pulverizar.

Os insetos escolhidos para esses testes comparativos foram os afídeos da couve, da espécie *Brevicoryne brassicae* (L.) já conhecidos como sensiveis à ação dos rotenoides, e que foram coletados nas culturas de couve da Chácara do Instituto Biológico e usados em todos os estádios de desenvolvimento.

Depois de selecionados, os afídeos eram, no dia do teste, colocados, numa média de 50, em uma das partes de caixas de Petri de 8,2 cm de diametro, préviamente forradas com um circulo de papel de filtro, e submetido então à aplicação dos inseticidas na torre de pulverização (estampa 21, fig. *G*).

Após a aplicação, esses pequenos circulos de papel de filtro contendo os insetos já tratados, eram colocados sôbre uma fôlha destacada de couve e mantidos em uma caixa de Petri de grande tamanho para as observações depois de 24 hs. (Est. 20, fig. *F*). A transferência dos afídeos dos circulos de papel de filtro para as fôlhas se realizava automatica e naturalmente conforme a estampa 21, figs. *H* e *I*.

Decorridas as primeiras 24 hrs. os afídeos sobreviventes eram transferidos, por meio de um pincel, para nova fôlha de couve, onde permaneciam até serem realizadas ás observações finais de mortalidade, depois de 48 horas.

IV — RESULTADOS GERAIS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos estão resumidos nas tabelas 1, 2 e 3; com eles foram traçadas as curvas de dosagem-mortalidade pelo processo de BLISS (2, 1935). Foi tomada em consideração a mortalidade natural ocorrida nas testemunhas, isto é, pulverizados simplesmente com a agua, tendo sido feito o ajustamento por alterações nos coeficientes de peso, segundo metodo aproximado do FINNEY (5, 1940). As equações calculadas foram as seguintes: $Y = 3{,}808x - 0{,}083$, $Y = 3{,}437x - 0{,}955$ e $Y = 3{,}365x - 2{,}428$ respectivamente para o "timboril", extrato etéreo e oleo extraido por compressão das sementes de *Pachyrrhizus tuberosus*, sendo aplicado o "test" X^2, cujos valores mostraram que os dados estão homogeneos. Segundo a ordem citada anteriormente, esses valores são os seguintes: $X^2 = 6{,}009$ para $n = 7$, $X^2 = 7{,}303$ para $n = 7$ e $X^2 = 5{,}518$ para $n = 6$.

Para cada inseticida experimentado, a tabela 4 mostra a concentração em cm³ por litro de emulsão, necessaria para matar 50 e 95% de uma população de afídeos, donde podemos verificar que o "Timboril" foi aproximadamente 2,3 vezes mais toxico do que o extrato etéreo de *Pachyrrhizus tuberosus* e 7,5 vezes mais do que o oleo dessa planta extraido por compressão; por outro lado, o extrato etéreo foi 3,2 vezes mais toxico do que o oleo de compressão.

GRÁFICO

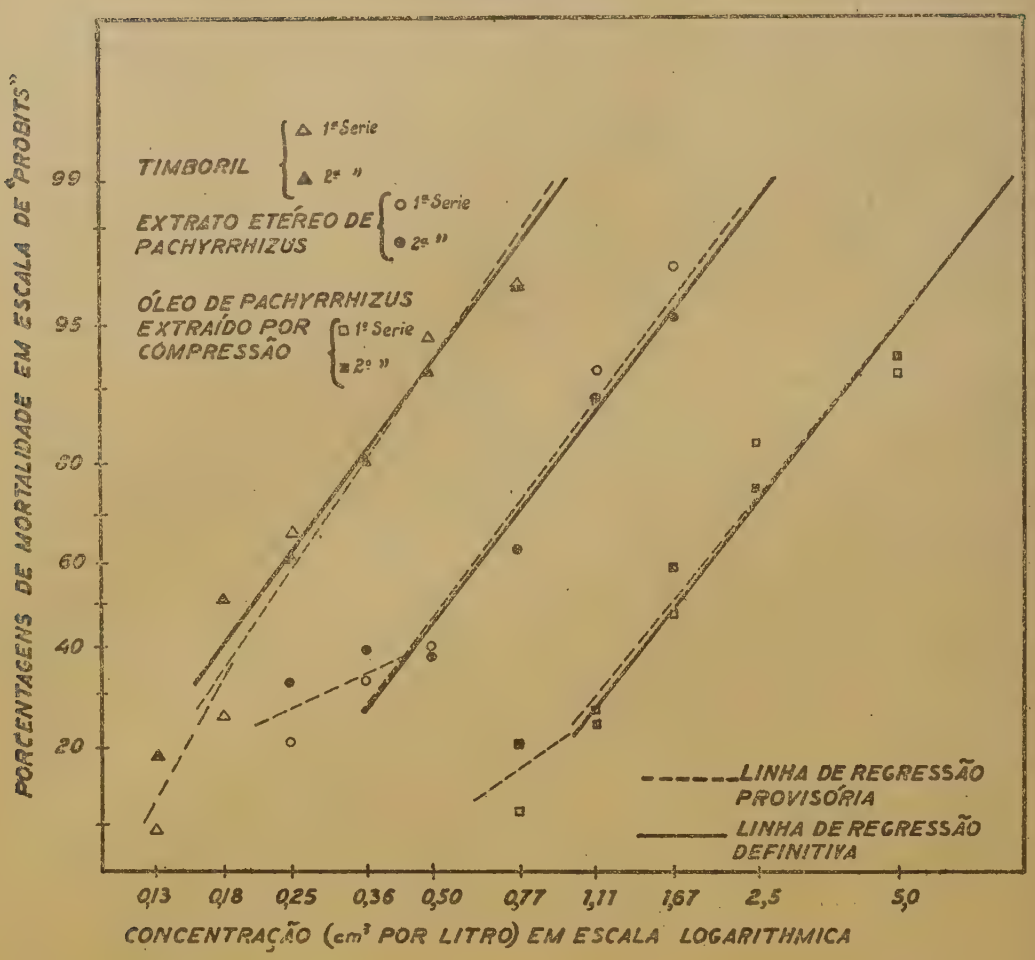


TABELA 4

Toxidês do "Timboril", extrato etéreo e oleo extraido por compressão das sementes de *Pachyrrhizus tuberosus* (LAM.) SPRENG., para o afídeo *Brevicoryne brassicae* L.

Inseticida	Concentração em cm3 por litro de emulsão necessária para matar	
	50%	95%
Timboril	0,22	0,58
Extrato etéreo de *Pachyrrhizus tuberosus* . .	0,52	1,50
Oleo de *Pachyrrhizus tuberosus* extraido por compressão	1,68	5,00

TOXICITY OF THE CONSTITUENTS OF THE SEEDS OF "PACHYRRHIZUS TUBEROSUS (LAM.) SPRENG." RED VARIETY, FOR THE APHID *"BREVICORYNE BRASSICAE* L." (HOMOPTERA-APHIDIDAE)

Abstract

Experiments were made to verify the toxicity of the constituents of the seeds of a red variety of Pachyrrhizus tuberosus (Lam.) Spreng. (Yam bean).

Both an ether extract (in a Soxhlet apparatus) and a compression oil (in a mechanical press) were obtained from the seeds with yields of 25% and 11.5% respectively. A comparison was made with an insecticide containing Lonchocarpus root extract with 5.39% rotenone and 0.93% pyrethrins.

The L.D. 50% and L.D. 95% for the Aphis Brevicoryne brassicae L. were found to be: 0.22 cc and 0.58 cc; 0.52 cc and 1,50 cc and 1.68 cc and 5,00 cc per liter of emulsion, respectively of the Lonchocarpus extract, the ether extract of Yam Bean and the compression oil of the same plant.

BIBLIOGRAFIA

1 — ALTIMIRANO, F. R., et al. (1) — 1907 — Datos para la materia médica mexicana. *Inst. Méd. Nac.*, 4: 1-35.

2 — BLISS, C. I. — 1935 — The calculation of the dosage — mortality curve. *Ann. appl. Biol.*, 22: 134-167.

3 — BOORSMA, W. G. (2) — 1910 — Over de vergiftigheid van de bangkoewang plant (Pachyrrhizus angulatus Rich). *Teysmannia*, 21: 624-637.

4 — CLAUSEN, R. T. — 1944 — A botanical study of the yam beans (Pachyrrhizus). *Cornell University Agric. Memoir* 264, 38 pp.

5 — FINNEY, D. J. — 1944 — The application of the probit method to toxicity test data adjusted for mortality in the controls. *Ann. Appl. Biol.*, 31: 68-74.

6 — GRESHOFF (3) — 1890 — *Meded. Uit's Lands Plantetuin*, 7.

7 — HANSBERRY, R. e CECIL SU-SIN LEE — 1943 — The yam bean, Pachyrrhizus erosus Urban, as a possible inseticide. *J. Ec. Ent.*, 36, 2: 351-352.

8 — HUART, A. (1) — 1902 — La jicama. Su classificacion, su cultivo, sus usos. *Soc. Mex. Bot.*, 26: 555-558.

9 — HWANG, S. L. (2) — 1941 — A preliminary report on the chemical composition of yam bean (Pachyrrhizus erosus Urban), a new rotenone bearing plant. *Kwangsi Agriculture*, 2, 4: 269-280.

10 — LIU, C. Y. e Y. F. HSU (2) — 1943 — Studies on a new vegetable insecticide, the yam bean (Pachyrrhizus erosus Urban). *Kwangsi Agriculture*, 2, 1: 28-48.

11 — NAG, N. C. et al. — 1935-36 — Seeds of Pachyrrhizus angulatus. *Trans. Bose Research Inst.*, Calcutta, 11: 83-89. Referências em Chemical Abs., 33: 3422 (1939).

12 — NORTON, L. B. — 1943 — Rotenone in the yam bean (Pachyrrhizus erosus). *Jour. Amer. Chem. Soc.*, 65, 11: 2259-2260.

13 — NORTON, L. B. — 1945 — Constituents of the insecticidal resin of yam bean (Pachyrrhizus erosus). *Jour. Amer. Chem. Soc.*, 67, 9: 1609-1614.

14 — O'KANE, C. W. et al. — 1943 — *Laboratory procedures in studies of chemical control of insects.* Ed.: American Association for the advancement of science Smithsonian Institution Building, Washington, D. C., 20, 206 pp. cf. pp. 115-117.

15 — PECKOLT, G. — 1927 — Cultura do Jacatupé ou "Batata de casca fina". Edição de *"Chacaras e Quintaes"*, S. Paulo, 16 pp. 2.ª Edição.

16 — SU-SIN LEE, C. e R. HANSBERRY — 1943 — Toxicity studies of some chineses plants. *J. Enc. Ent.*, 36, 6: 915-921.

17 — VAN SILLEVOLDT (3) — 1899 — *Ach. Pharm.*, 237: 595.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 18

Figs. *A* e *B* — Vista geral da cultura de Jacatupé realizada no campo experimental Ibirapuéra (Instituto Biológico).

Estampa 19

Fig. *C* — Tuberculos comestiveis de Jacatupé com dimensões normais, colhidos na cultura experimental do Instituto Biológico.

Fig. *D* — A abundante quantidade de vagens produzida por um pé de Jacatupé da cultura experimental do Instituto Biológico.

Estampa 20

Fig. *E* — Dispositivo utilizado nas aplicações dos inseticidas: *a* — Torre metálica. *b* — Reservatório. *c* — Atomizador. *d* — Caixa de madeira para suporte da torre e recepção dos inseticidas. *e* — Caixa de Petri onde são colocados os insetos. *f* — Diafragma. *g* — Manómetro de mercurio. *h* — Filtro de ar. *i* — Valvula reguladora da pressão.

Fig. *F* — Vista geral das caixas de Petri contendo afídeos já tratados.

Estampa 21

Fig. *G* — Caixa de Petri contendo os afídeos a serem pulverizados.

Fig. *H* — Caixa de Petri mostrando os afídeos logo depois de tratados e antes de sua passagem espontanea, dos circulos de papel absorvente para as folhas de couve.

Fig. *I* — Caixa de Petri mostrando a transferência quase total dos afídeos, espontaneamente, dos circulos de papel absorvente para as folhas de couve.

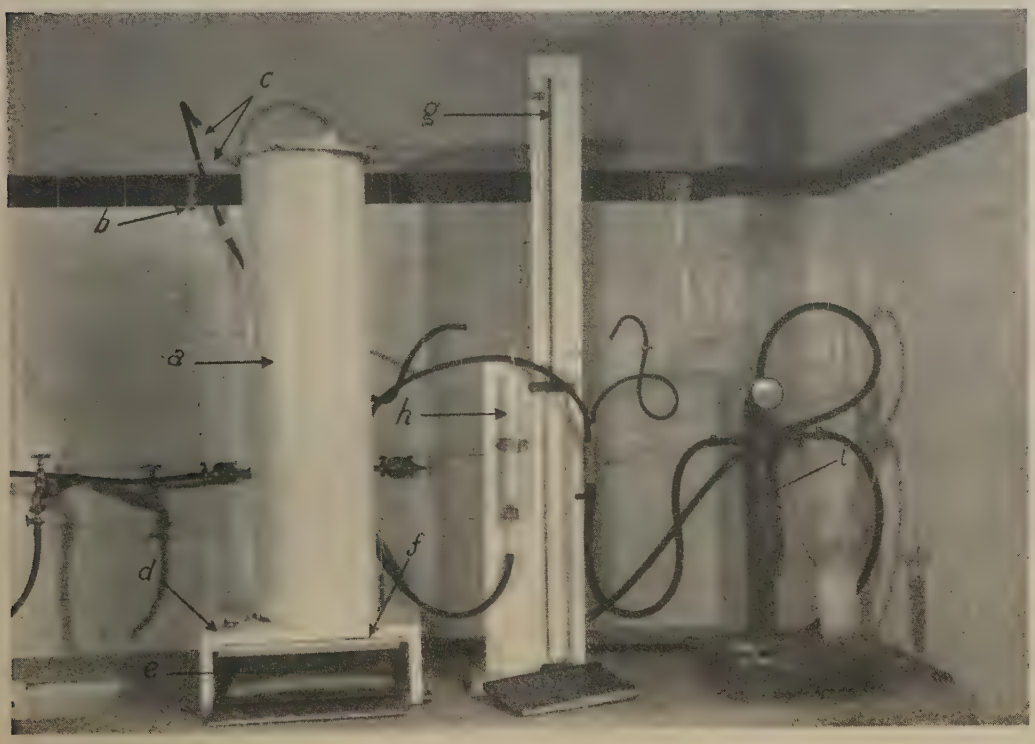
Nota: Os trabalhos assinalados com (1), (2) e (3) foram consultados respectivamente pelos referatos de CLAUSEN, R. T. (1944), HANSBERRY, R. (1943) e NORTON, L. B. (1945).

A

B

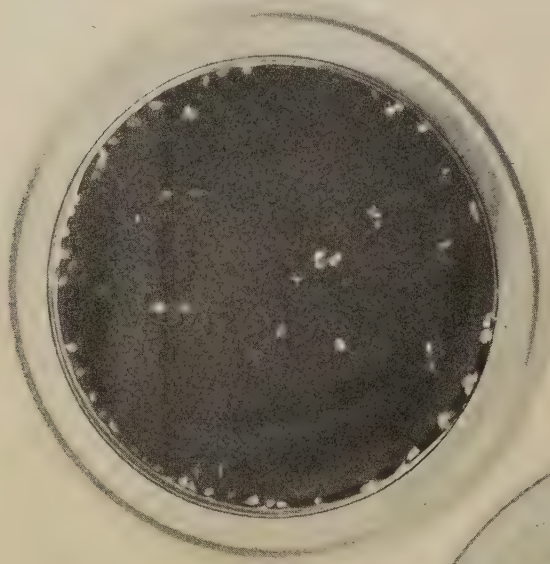
D

C

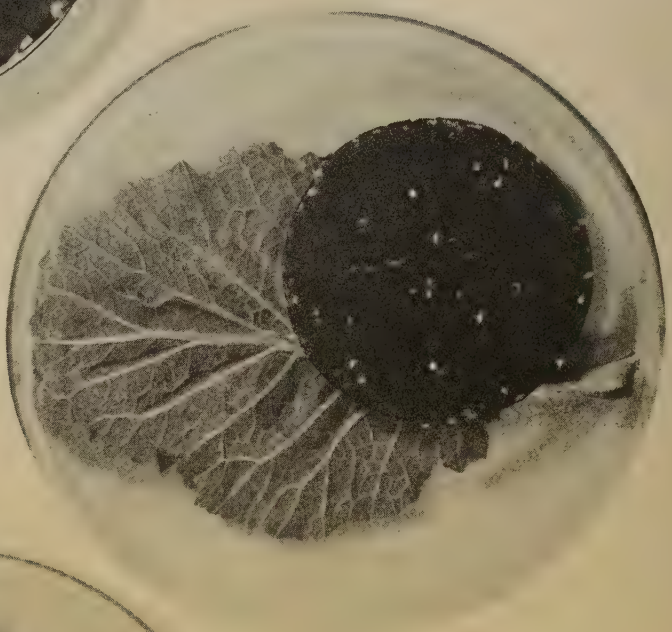


E

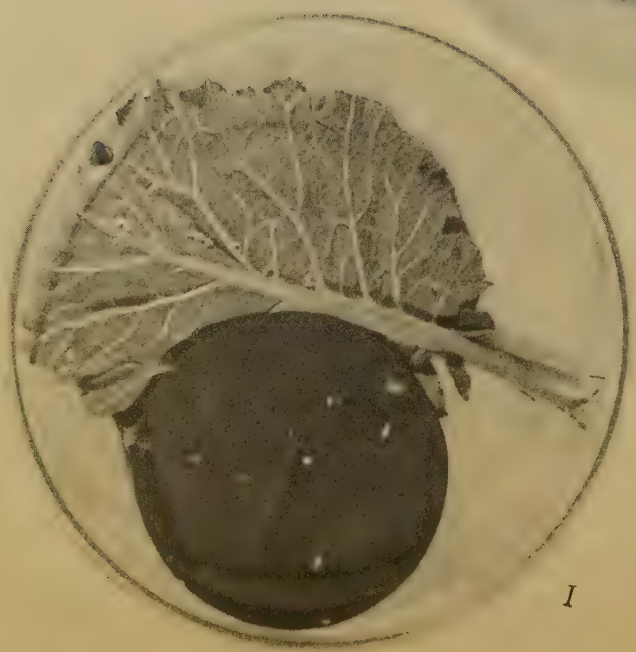
F



G



H



I

Vol. 17 — Art. 17 Dezembro de 1946

DETERMINISMO DA EVASÃO DAS LARVAS DE "HABRONEMA" SP. DA TROMBA DA MOSCA DOMÉSTICA

POR

M. J. de Mello & C. Pereira

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 1 figura no texto

INTRODUÇÃO

RANSOM (1913) admitira que as larvas dos habronemas abandonassem a tromba da mosca doméstica na ocasião em que esta suga a humidade da mucosa do beiço do cavalo, ao passo que BULL (1919) chamou a atenção para a importância do calor e da humidade, nesse fenômeno. ROUBAUD & DESCASEAUX (1921) demonstraram a saida de larvas da cabeça isolada de moscas em solução fisiológica aquecida, bem como (1923) no mesmo meio, a 37°C, em moscas sem pernas nem asas, contanto que o líquido banhasse amplamente a tromba do insecto; obtiveram ainda os mesmos resultados no beiço do cavalo, concluindo pela importância da humidade e da temperatura, embora conjeturassem um possivel termotactismo.

TORRES (1925-*a*) achou desnecessária a influência do calor, pois conseguiu a saida das larvas mesmo em sangue de cavalo à temperatura ambiente, o que o levou a considerar o fenômeno regido por um hematotropismo das larvas. Reconheceu ainda (1925-*b*) que a simples humidade não basta, devendo ser constituida por sangue desfibrinado de cavalo, pois com sangue de gente, de coelho e de cobaia obtinha resultados negativos, dando-se o mesmo com água açucarada, leite de vaca, saliva humana e de cavalo.

Nossas experiências visaram o esclarecimento do mecanismo deste interessante e importante problema, que nos pareceu ainda não enunciado convenientemente.

MATERIAL E TÉCNICA

As moscas eram criadas em fezes de cavalos com habronemose gástrica, em cristalizadores de vidro. Eram submetidas à experimentação somente a partir do quinto dia da emergência, de acordo com os dados de MELLO & CUOCOLO (1943).

As experiências foram realizadas em aparelho de banho-maria, de cobre, com tampa de aneis concêntricos e regulador de nivel (fig. 1). Os líquidos a experimentar eram postos em pequena cápsula de porcelana, cuja temperatura era determinada pelo banho-maria e indicada por um termômetro, cujo bulbo

mergulhava no conteúdo da cápsula. Ao nivel do líquido em esperiência e apoiado na parede da cápsula, um disco de borracha rígida, parafinado, provido de várias perfurações de 3 mm de diâmetro, uma das quais para deixar passar a haste do termômetro, não só impedia que as moscas corressem o risco de se afogar, como reduzia a intensidade da evaporação.

As moscas ficavam numa caixa de tela metálica, sem fundo, assentada no conjunto do banho-maria com a cápsula de porcelana. Um cristalizador de

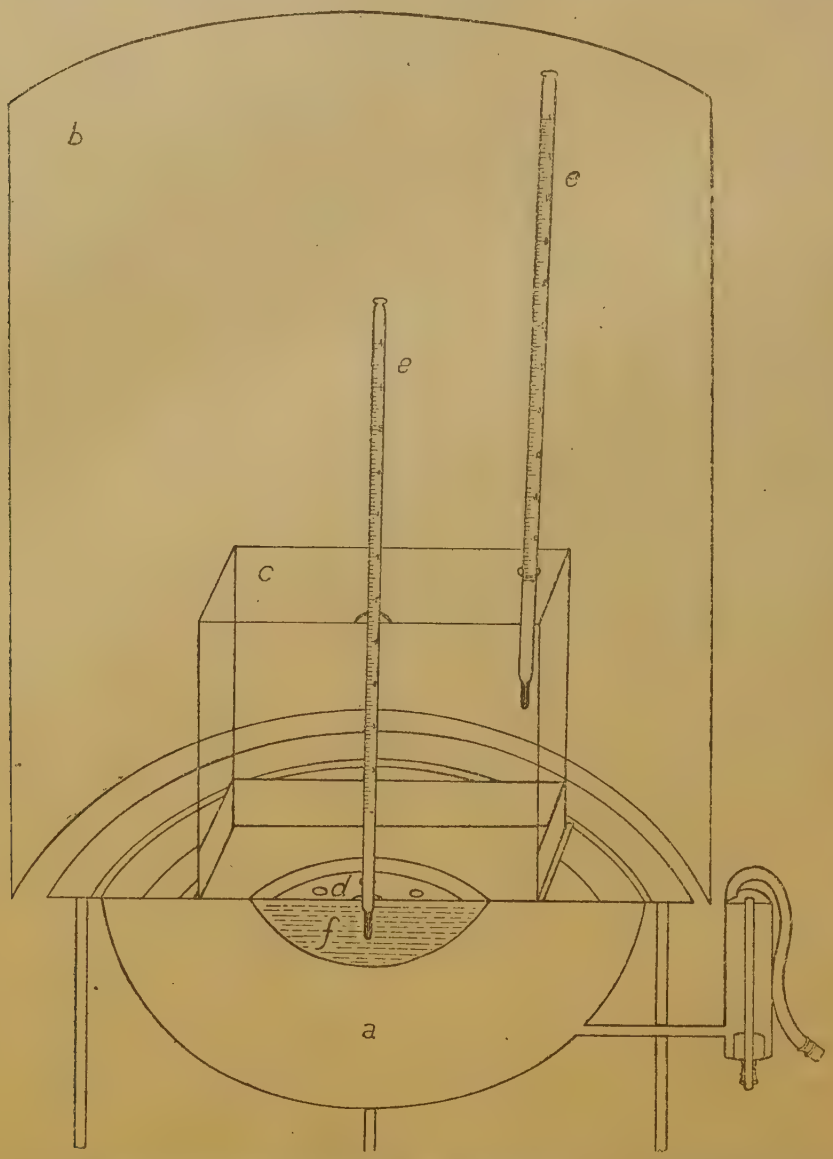


Fig. 1: *a* — Aparelho de banho-maria para estabilizar a temperatura do soro (*f*); *b* — Cristalizador emborcado, formando uma camara de temperatura ambiente, de 25 cm de diâmetro por 30 cm de altura; *c* — Caixa telada para conter as moscas em experiência, medindo 12 × 12 × 13 cm; *d* — Flutuador de borracha furada para permitir que as moscas se alimentem sem cair no líquido em experiência. O diâmetro do flutuador é de 6 cm, o diâmetro dos furos é de 3 mm; *e* — Termômetros para marcar as temperaturas do ambiente e do soro; *f* — Soro de cavalo em uma cápsula de porcelana de 7 cm de diâmetro, ou 30 cm³ de capacidade.

vidro, emborcado sobre o conjunto, e cujo interior podia ser resfriado ou aquecido por meio de jactos de ar saturado de humidade e a temperatura conveniente, determinava a temperatura ambiente para as moscas, indicada por um segundo termômetro nas vizinhanças.

RESULTADOS

As experiências preliminares, realizadas no verão e outono últimos, confirmaram em linhas gerais os resultados de TORRES (1925-*a* e *b*), pois obtinhamos a saida de larvas da tromba das moscas sempre que estas se alimentavam com sangue, plasma ou soro de cavalos e burros. Por outro lado, quando a alimentação era feita com análogo material de outra proveniência, como gente, coelho, cobaia, vaca, porco, carneiro e galinha, os resultados eram sistematicamente negativos, mesmo a temperaturas de 34-37°C.

Outros materiais experimentados, tais como soluções diluidas de açucar, mel, dextrina, leite, leite condensado, saliva humana, saliva e suor de cavalo, nas mesmas condições térmicas, não propiciaram a evasão das larvas.

As moscas alimentavam-se avidamente com todos os tipos de alimentos utilizados, excepto com saliva e suor.

Entretanto as primeiras ondas de frio interferiram nos resultados das nossas experiências e obrigaram-nos a reconsiderar o assunto, pois havia dias em que não saiam larvas, ou somente muito poucas, mesmo quando as condições de trabalho pareciam as melhores.

Iniciamos então as experiências em que se levou em maior consideração a influência da temperatura. De novo resultados positivos só foram obtidos com material de cavalo e de burro, excepto uma ou outra larva que saia, ocasionalmente, nos outros alimentos experimentados.

Verificamos que o soro proporciona os mesmos resultados que o sangue desfibrinado.

Os dados da tabela, condensados no gráfico, mostram que as larvas só conseguem sair da tromba da mosca em quantidade apreciavel quando a temperatura ambiente não é inferior a 22° C, e a do líquido em experiência não inferior a 23° C.

Ora, a temperatura do ambiente em que TORRES (1925-*a*) trabalhara, no Rio de Janeiro, estava compreendida entre 26,5 e 30,5°C, o que explica os resultados a que chegou; no inverno paulista ela desceu frequentemente abaixo de 22° C, determinando muitos resultados negativos nas nossas experiências.

Os resultados por nós obtidos são bem definidos nas temperaturas próximas ao ângulo de inflexão da curva que separa os resultados positivos dos negativos, conforme o demonstra o gráfico.

TABELA

Evasão das larvas de *Habronema* da tromba da mosca doméstica em diversas condições de temperatura

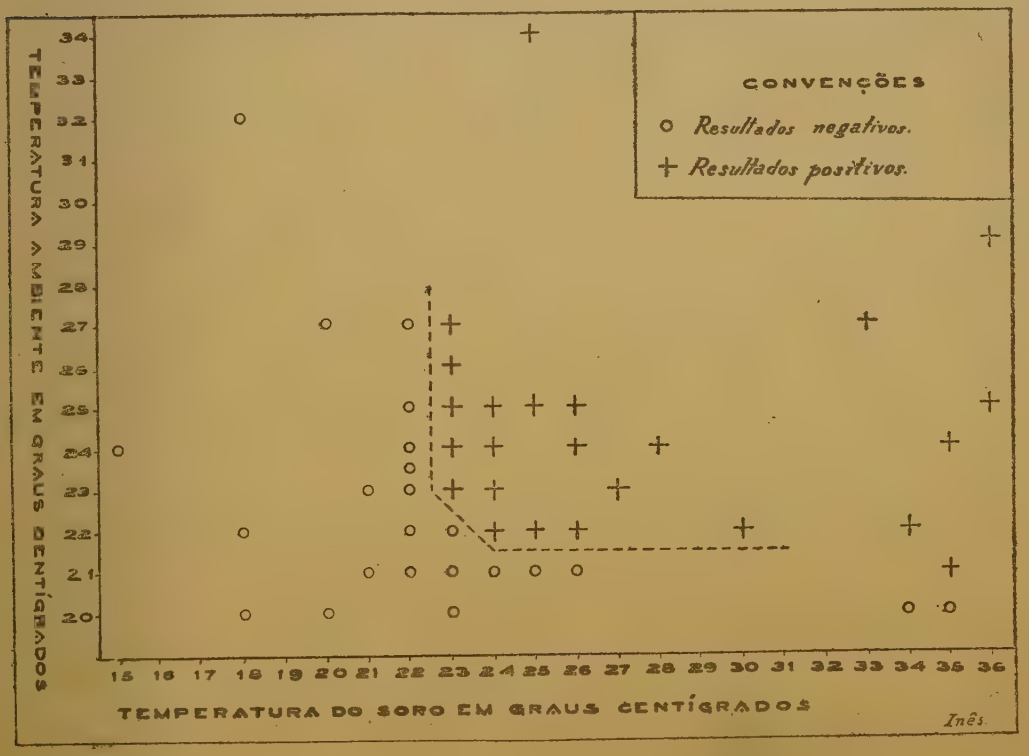
Data (1946)	Temperatura do ambiente	(° C) do soro	Nº de moscas usadas	Duração da experiência em minutos	Número de larvas		Total	% de evasão
					Saídas	Restantes		
14/VI	15	20	10	30	0	94	94	0,0
2/XII	19	35	20	20	0	129	129	0,0
15/VI	20	18	10	30	0	91	91	0,0
18/VI	20	18	10	30	0	90	90	0,0
4/VII	20	20	10	30	0	75	75	0,0
26/IX	20	23	20	10	0	142	142	0,0
2/XII	20	34	20	20	0	97	97	0,0
10/XII	20	35	20	20	0	120	120	0,0
4/VII	21	21	10	30	0	75	75	0,0
14/IX	21	21	20	10	0	36	36	0,0
16/IX	21	21	20	30	0	43	43	0,0
17/IX	21	22	20	10	0	49	49	0,0
9/XII	21	22	20	30	0	92	92	0,0
10/XII	21	23	20	30	0	102	102	0,0
17/IX	21	24	20	10	0	54	54	0,0
11/XII	21	24	20	30	0	70	70	0,0
11/XII	21	25	20	10	0	91	91	0,0
11/XII	21	26	20	10	0	79	79	0,0
22/VII	21	35	30	30	11	121	132	8,3
18/VI	22	18	30	30	0	80	80	0,0
12/XII	22	22	20	30	0	99	99	0,0
12/XII	22	23	20	30	0	105	105	0,0
12/XII	22	24	20	10	10	66	76	13,2
13/VI	22	25	10	10	68	10	78	87,0
13/XII	22	26	20	30	11	57	68	16,2
13/VI	22	30	30	30	40	48	88	45,4
15/V	22	34	33	120	313	52	365	85,7
14/VI	23	21	12	90	0	117	117	0,0
9/XII	23	22	20	30	0	102	102	0,0
24/IX	23	22	20	15	0	56	56	0,0
23/IX	23	22	20	10	0	60	60	0,0
9/XII	23	22	20	30	0	102	102	0,0
10/XII	23	23	20	20	0	92	92	0,0
21/IX	23	23	20	10	0	76	76	0,0
24/IX	23	23	20	10	1	134	135	0,7
29/IX	23	23	20	20	1	43	44	2,3
12/XII	23	24	20	30	5	55	60	8,3
1/X	23	27	20	10	36	59	95	37,9
24/IX	23,5	22	20	10	0	41	41	0,0
10/XI	24	15	20	30	0	136	136	0,0
9/XII	24	22	20	30	0	109	109	0,0
12/XII	24	23	20	30	9	75	84	10,7
20/IX	24	23	20	10	1	93	94	1.1
17/IX	24	24	20	10	3	163	166	1,8
1/X	24	24	20	10	4	57	61	6,5
12/XII	24	26	20	30	23	53	76	30,3
14/XI	24	28	20	15	79	35	114	69,3
10/VII	24	35	20	30	83	108	191	43,5
9/XII	25	22	20	30	0	94	94	0,0
12/XII	25	22	20	30	0	82	82	0,0

Data (1946)	Temperatura do ambiente	(° C) do soro	N° de moscas usadas	Duração da experiência em minutos	Número de larvas		Total	% de evasão
					Saídas	Restantes		
23/IX	25	23	20	10	0	58	58	0,0
23/IX	25	23	20	10	0	73	73	0,0
12/XII	25	23	20	30	17	71	88	17,0
9/XII	25	24	20	30	24	63	87	27,6
10/XII	25	25	20	30	14	54	68	20,6
10/XII	25	26	20	30	36	66	102	35,3
10/VII	25	36	20	30	137	67	204	67,1
4/VII	26	23	30	30	6	81	87	6,9
25/XI	27	20	20	15	0	130	130	0,0
27/XI	27	22	20	20	0	139	139	0,0
16/XI	27	22	20	30	0	116	116	0,0
25/XI	27	23	20	15	15	108	113	13,3
6/VII	27	33	24	30	182	52	234	77,7
16/VII	29	36	20	30	76	24	100	76,0
11/VII	32	18	10	30	0	131	131	0,0
11/VII	35	25	10	30	70	9	79	88,6

A medida que tal linha de separação se aproxima das temperaturas mais altas, os resultados deixam de ser tão claramente marcados, com tendência para favorecer a positividade dos achados.

De fato, a mosca de um ambiente muito aquecido poderá ter as larvas da tromba tão excitadas, que sua evasão se dá logo de início ao

GRÁFICO



tocar o alimento resfriado. É verdade que tal possibilidade pode ser contrabalançada pela menor demora do contacto com o alimento, quando este se acha em temperatura excessivamente baixa.

Por outro lado, a mosca em ambiente frio poderia ter a extremidade da tromba aquecida pelo soro muito mais quente, simulando uma evasão de larvas a temperatura aparentemente baixa do ambiente. Entretanto tambem esta possibilidade é neutralizada, na prática, pela crescente tendência das moscas à quietude, à medida que desce a temperatura ambiente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Das pesquisas realizadas conclue-se que ha um mínimo de temperatura ambiente (cerca de 22° C), abaixo do qual as larvas não abandonam a tromba da mosca em meio nutritivo algum, mesmo nas temperaturas em que os insectos ainda podem alimentar-se muito bem; e que acima dessa temperatura as larvas conseguem sair em soro, plasma ou sangue de equídeos, mas não em material proveniente de vários outros animais, domésticos ou de laboratório, nem em diversos líquidos orgânicos.

Parece-nos que, em princípio, podemos deixar de lado qualquer interpretação do fenômeno baseada no hemotactismo, dados os resultados negativos obtidos com o sangue de várias espécies animais, afora os equídeos.

Verificamos, entretanto, que, obrigando a mosca a distender a tromba e intrometendo esta numa pipeta estirada, com solução fisiológica aquecida, obtem-se a saida das larvas como se fosse em soro de equídeo.

Inclinamo-nos portanto a crer que a evasão das larvas do helminto depende mais de alguma atitude especial da tromba da mosca, em determinadas oportunidades, do que propriamente de qualquer tactismo particular delas.

Ora, o estudo do comportamento das moscas durante a alimentação pareceu-nos fornecer a chave do problema.

Quando se alimentam com soro, plasma ou sangue de cavalo ou de burro, as moscas mergulham mais profundamente a tromba e permanecem quietas mais tempo, poucas vezes mudando de atitude ou de lugar. Excitadas pela temperatura, as larvas agitam-se muito mais energicamente e produzem efrações nos limites das superfícies externa e interna dos labelos, pelas quais se insinuam e conseguem sair.

Em qualquer outro tipo de alimento, entretanto, o comportamento das moscas é diferente, muito embora possam ingurgitar-se rapidamente: a tromba não se aprofunda no líquido, que é apenas

tocado rápida e sucessivamente pela face interna dos labelos. Embora algumas larvas cheguem a insinuar suas extremidades, freneticamente agitadas, por soluções de continuidade feitas nos labelos, na situação já assinalada, falta-lhes tempo para conseguir suficiente apoio no líquido externo e assim se desvencilharem da tromba da mosca. O que significa que o resultado de uma experiência não deve deixar de ser considerado negativo, pelo simples fato de uma ou outra larva, ocasionalmente, conseguir sair da tromba, o que pode acontecer por mero acaso.

MECANISMO DA INCIDÊNCIA ESTACIONAL DA ESPONJA

Nas regiões temperadas a habronemose cutânea dos equídeos, "esponja" ou "ferida de verão", incide principalmente nos meses quentes do ano; como são estes os que proporcionam maior quantidade de moscas, havia a impressão generalizada de que a maior frequência das esponjas dependesse apenas do maior número de moscas.

Embora o fato não deixe de agravar a situação, é fora de dúvida que não parece haver uma relação simples entre a quantidade de moscas e a de esponja dos equídeos.

Haviamos verificado previamente, o que não tivemos ainda ocasião de noticiar, que nos meses frios não só as fezes dos cavalos com habronemose gástrica não são menos infestantes do que nos meses quentes, como, ainda, que as larvas de moscas são igualmente susceptiveis à infestação, e as moscas adultas permitem perfeitamente a evasão das larvas de habronema, quando postas em condições adequadas.

Assim, a condição básica para o aparecimento da esponja parece-nos constituida por uma temperatura ambiente não inferior a 22° C, associada a efração na pele do equídeo que verta serosidade, onde possam alimentar-se moscas criadas em fezes de cavalos com habronemose gástrica.

Naturalmente as temperaturas mais elevadas, combinadas com adequada humidade relativa do ar, tendem a incrementar a população de moscas e a aumentar sua atividade, disso resultando maiores oportunidades de contacto entre moscas e cavalos, o que sem dúvida será um fator subsidiario importante na intensificação dos surtos de esponja.

DETERMINISM OF THE EVASION OF THE LARVAE OF *HABRONEMA* SP. FROM THE PROBOSCIS OF THE DOMESTIC FLY

Abstract

The experimental study of the conditions that regulate the evasion of the larvae of Habronema from the proboscis of the domestic fly led us to the following results:

a) The evasion of the larvae happens only when the environment and food temperatures are not below 22° C. and 23° C., respectively.

b) The evasion occurs during the normal feeding of the flies on blood, plasma or serum of equids (horse and donkey).

c) The evasion was also obtained when the proboscis of the fly was distended and sunk in sera of man, rabbit, guinea-pig, cow or swine; furthermore, it was also obtained under the same conditions, in sugar solution, honey, dextrin, milk, condensed milk and also saliva and sweat of horse at 34-37° C.

d) The evasion does not depend on a special tactism because a drop of horse blood put on a dish containing larvae in saline does not attract them.

e) The evasion depends, therefore, on an intimate and prolonged contact and occurs normally only when the flies feed on blood or serum of equids. The feeding of flies on other tested substances is intermittent and so the larvae do not have the chance to ultimate the evasion.

f) The diurnal environment temperature, not below 22° C., seems to be the main factor of the determinism of the stational incidence of the summer sores of the equids.

BIBLIOGRAFIA

Bull, L. B. — 1919 — A contribution to the study of habronemiasis. *Transactions of the Royal Society of South Australia,* **43**: 85-141, 3 est.

Mello, M. J. de & R. Cuocolo — 1943 — Alguns aspetos das relações do Habronema muscae (Carter, 1861) com a mosca doméstica. *Arq. Inst. Biologico,* S. Paulo, **14**: 227-234, 1 est.

Ransom, B. H. — 1913 — The life history of Habronema muscae (Carter), a parasite of the horse transmitted by the house fly. *U. S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry, Bulletin* **163**; 36 pp.

Roubaud, E. & J. Descazeaux — 1921 — Contribution à l'histoire de la Mouche domestique comme agent vecteur des habronémoses d'Équidés. *Bulletin de la Socité de Pathologie Exotique,* **14** (16): 471-506, 3 est.

Roubaud, E. & J. Descazeaux — 1923 — Deuxième contribution à l'histoire des mouches dans leurs rapports avec l'évolution des habronèmes d' Équidés. *Ibidem,* **15** (10): 978-1001.

Torres, C. M. — 1925*a* — Déterminisme de la liberation spontanée des larves d' Habronema muscae (Carter, 1861) par la trompe de la mouche domestique: importance de l'hematotropisme. *Comptes Rendues des Séances de la Societé de Biologie de Paris,* **93**: 33-34.

Torres, C. M. — 1925*b* — L'hematotropisme des larves mûres d'Habronema muscae (Carter, 1861). *Ibidem,* **93**: 38-39.

Vol. 17 — Art. 18 Dezembro de 1946

SOBRE O EQUILÍBRIO GENÉTICO ESTAVEL

POR

C. Pereira & M. P. de Castro

Do Instituto Biológico de S. Paulo

MENDEL (1866) demonstrou que a herança se processa por intermédio de elementos descontínuos, cujo comportamento na formação dos gametos, tal como o destes na fertilização, é regido pelas leis do acaso, sendo determinavel portanto pelo cálculo das probabilidades.

Na mesma ordem de idéias, PEARSON (1904) reconheceu que as proporções mendelianas do monohibridismo são "estaveis" e traduzem o estado de equilíbrio de uma população suficientemente grande e isolada, com reprodução sexuada e ao acaso, contanto que os genótipos em jogo sejam equivalentes do ponto de vista seletivo. Realmente, satisfazendo a distribuição $p_1 : 2q_1 : r_1$ a condição necessária $q_1^2 = p_1 r_1$, sua distribuição continuará inalterada depois da segunda geração, sejam quais forem os valores de p, q e r.

HARDY (1908) chegou, independentemente e do mesmo modo, a conclusões iguais. Utilizou, no entanto, na sua demonstração, uma tabela de contingência, que, a-pesar-de laboriosa, gosa de aceitação corrente.

Entretanto, como se trata de um problema de probabilidade composta, parece-nos mais simples e intuitivo deduzir essa propriedade a partir da consideração de que as proporções mendelianas obedecem à lei binominal, o que acontecerá necessariamente tanto no espaço como no tempo.

Ora, no desenvolvimento do binômio, os coeficientes de cada termo correspondem às ordenadas do polígono de frequências, ao passo que os expoentes dos fatores de cada termo formam progressões de sentido inverso, com os mesmos extremos e a mesma razão, o que garantirá evidentemente a estabilidade do sistema sempre que para isso ocorram as condições necessárias, acima enumeradas.

Agradecemos a A. M. Penha, L. A. Berthet e P. E. Vanzolini críticas e sugestões de grande valia.

ON THE STABILITY OF THE GENETIC EQUILIBRIUM

Abstract

As the genetic equilibrium is a problem of probability, it seemed easier to deduce this property from the consideration that the mendelian proportions obey the binomial law.

Now, in the binomial expansion, the coefficients correspond to the ordinates of the frequencies polygon, at the same time that the exponents of the factors of each term perform two progressions of a inverted sense, with the same extremes and the same ratio. Of course, such a system may be "stable" if in adequate conditions.

BIBLIOGRAFIA

HARDY, G. H. — 1908 — Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, 28, n.º 706: 49-50.

MENDEL, G. — 1866 — Experiments in plant-hybridisation. *Apud:* W. BATESON — 1913 — *Mendel's principles of Heredity.* Cambridge; p. 335-379.

PEARSON, K. — 1904 — On a generalised theory of alternative inheritance, with special reference to Mendel's laws. *Transactions Royal Society Phil.*, 203: 60. *Apud:* G. H. HARDY (1908).

Vol. 17 — Suplemento Dezembro de 1946

ENCEFALOMIELITES INFECCIOSAS DOS EQUIDEOS

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 3 figuras no texto e estampas 22-28

SUMÁRIO

I — ESTADO ATUAL DO PROBLEMA NO BRASIL

1 — Caracterização clínica das epizootias no nosso meio Diagnóstico clínico e experimental
2 — Isolamento do primeiro virus brasileiro em 1937
3 — Experiências de imunidade tissular cruzada
4 — Experiências de imunidade humoral cruzada
5 — Posição imunológica do virus brasileiro
6 — Outros estudos realizados no País

II — ESTUDO GERAL DO GRUPO DAS ENCEFALOMIELITES DO CAVALO

1 — Histórico geral do grupo: 1813-1922
2 — A doença de Moussu e Marchand
3 — A doença de Borna
4 — Relações e diferenças entre as doenças do grupo

III — A ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DOS EQUIDEOS NA AMÉRICA

1 — Histórico: 1847-1930
2 — Descoberta do primeiro virus americano em 1930
3 — Desenvolvimento atual do assunto
4 — Os três tipos de virus
5 — Distribuição geográfica e importância econômica
6 — Estudo clínico
7 — Diagnóstico clínico e experimental
8 — Enganos de diagnóstico
9 — Isolamento do virus
10 — Epidemiologia
11 — A infecção humana
12 — Patogenia
13 — A infecção experimental
14 — Estudo do virus
15 — Anatomia patológica
16 — Imunologia e profilaxia

Percorrendo a velha literatura, examinando as fontes que servem de alicerce aos nossos conhecimentos sôbre o grupo das encefalomielites infecciosas do cavalo, vemos surgir os primeiros relatos gerais de epizootias em 1813, na Alemanha, e em 1847, nos Estados Unidos. Tomando como ponto de referência aquela primeira data, é

facil verificar que durante um século o conhecimento do assunto quase não avançou. Todo êsse longo período, pobre em descobertas, em que o problema permaneceu nebuloso e quase estacionário, coincide com o período de incertezas relativas à verdadeira etiologia. Só duas ordens de trabalhos fundamentais foram realizados durante essa primeira fase e resistiram até hoje: o estudo clínico e sobretudo o estudo histológico. Eles constituem os dois primeiros marcos bem colocados e sólidos na longa estrada que em seguida e só muito depois se abriu.

No que se refere à etiologia, a literatura veiu acumulando descobertas novas e falsas, que cairam afinal todas, no momento em que o problema foi deslocado noutra direção e orientado para o lado dos virus. Quando a etiologia correta passou a ser fixada, o assunto foi logo clareado ràpidamente, em quasi todas as direções sondadas.

Isso mostra de modo muito sugestivo que, no caso, o conhecimento da etiologia foi fundamental e decidiu do progresso futuro. Deslocado para a direção dos virus em 1922, na Europa, e em 1931, na América, o problema é logo objeto de investigações que fornecem numerosas descobertas, muitas de grande importância como tentaremos mostrar, realizadas em cerca de vinte anos de trabalhos seriados.

O grupo das encefalomielites do cavalo é hoje, sem dúvida, um problema bem conhecido em vários de seus aspectos. A investigação sistematizada, conduzida sobretudo nos Estados Unidos desde 1931, forneceu um conjunto de fatos essenciais e uma excelente vacina, que é a chave do trabalho preventivo.

Já é agora possivel, em face do desenvolvimento do assunto, colocar em ordem os estudos e as conclusões que deles resultam sôbre êste grupo de doenças. Os livros, mesmo os tratados clássicos modernos, não o estudam de modo a permitir uma noção de conjunto completa, do assunto. E não poderiam fazê-lo, dada sua extensão atual, sua importância em patologia humana e animal, e dada a soma de aquisições importantes de data muito recente. Daí o interesse do estudo especial que tentamos realizar: alguns anos de trabalhos relativos á doença americana e seus virus permitem-nos agora realizar êste balanço geral dos nossos conhecimentos.

*
* *

Faremos, de início, uma síntese do estado atual do problema no Brasil, insistindo nos fatores de ordem clínica e experimental, essenciais ao conhecimento completo da doença no País. Em seguida estudaremos o histórico geral do grupo das encefalomielites dos equi-

deos. Depois examinaremos ràpidamente a doença de Moussu e Marchand, estudada na França e da qual muito pouco se conhece, e a doença de Borna, que grassa na Alemanha e é melhor conhecida, embora conserve ainda numerosos pontos inexplorados. Finalmente tentaremos um estudo mais completo da encefalomielite do cavalo na América, a doença mais importante do grupo, a melhor conhecida e a que mais de perto nos deve interessar.

I — ESTADO ATUAL DO PROBLEMA NO BRASIL

1 — CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DAS EPIZOOTIAS NO NOSSO MEIO DIAGNÓSTICO CLÍNICO E EXPERIMENTAL

Em 1937, em um primeiro trabalho sôbre o assunto, relatámos os estudos realizados em um surto de encefalomielite infecciosa do cavalo que grassara em março do mesmo ano, no município de Tatuí, no Estado de São Paulo.

Tratando-se da identificação inicial de uma doença, cuja existência no País devia ser suspeitada, pois é muito frequente nos Estados Unidos e já havia sido identificada na Argentina, todos os aspectos clínicos e experimentais ao nosso alcance foram considerados no sentido de evitar confusões e de realizar antes de tudo uma caracterização clínica segura do foco examinado e das epizootias no nosso meio, e em seguida um isolamento de virus para retirar o problema do carater de referências incompletas, pouco convincentes. Era necessário, antes de tudo, fornecer provas clínicas e experimentais definitivas da existência no País de uma encefalomielite infecciosa específica, produzida por virus, e sair de uma vez do terreno das referências vagas, sem apoio em dados concretos e seguros.

O problema aparecia, de início, cercado de certas dificuldades, já removidas nos Estados Unidos naquela época. Lá a doença era e continua sendo muito mais frequente e bem conhecida; a época do ano em que aparecem os surtos dá uma indicação preciosa ao diagnóstico; as áreas flageladas são conhecidas; os serviços especializados de pesquiza e mesmo de rotina do assunto são disseminados e, além disso, a raiva, sob a forma de graves epizootias, não se verifica, indo a área de disseminação dos morcegos hematófagos apenas até o México.

O carater infeccioso da doença no foco brasileiro, que surgia em pequenos surtos dispersos, em várias direções, sob a forma de casos em série, sem que fosse possivel responsabilizar qualquer outro fator acidental ou tóxico; a especificidade para o cavalo, em condi-

ções naturais, não sendo os bovinos atingidos, embora em muito maior número nas fazendas assoladas; a presença de casos curados, sem manifestações clínicas persistentes, e de casos curados, conservando sequelas; a época do ano em que surgiu o surto, em pleno verão de calor intenso e de chuvas abundantes; o quadro clínico no seu conjunto, com febre, encefalite, ataxia locomotora, constituiram alguns dos numerosos fatores de caracterização clínica da encefalomielite específica. Eles nos conduziram logo a enquadrar a epizootia em estudo no grupo das encefalites americanas, cuja etiologia fôra clareada em 1931 e cujo quadro clínico e epidemiológico tinha sólidos pontos de contato com o do foco brasileiro. Era possivel, assim, fugir com segurança à tentativa de diagnósticos falsos: botulismo, intoxicações forrageiras, raiva epizoótica, e constatar, logo, que se tratava de um quadro de encefalite específica dada por virus.

Tinham e continuam tendo grande importância em nosso meio esses fatores de caracterização clínica das epizootias, que permitem, num inquerito bem conduzido nos focos, afastar logo confusões e diagnósticos falsos. É conveniente tornar bem claro que é possivel, não em casos isolados, mas em epizootias, caracterizar um surto de encefalite específica, afastando outras doenças infecciosa, ou tóxicas, ou acidentais, de quadro clínico semelhante em linhas gerais e a um exame superficial, mas de nenhum modo idêntico, a um exame mais completo.

A possibilidade de confusão com a raiva foi, *a priori*, independentemente de qualquer estudo de laboratório, logo afastada. E deve sê-lo sempre. A ausência de antecedentes epidemiológicos relativos ao cão e aos morcegos hematófagos, presentes nos surtos de raiva, a especificidade para os equideos, não sendo os bovinos atingidos, a presença de casos curados, o quadro clínico onde predominam sintomas característicos de uma encefalite, afastavam logo a hipotese da raiva. No laboratório, a pobreza de resultados nas inoculações realizadas, quando o virus rábico é facilmente isolavel, as dificuldades das primeiras passagens, a ausência de corpúsculos de Negri em cérebros de animais com a doença natural e de animais inoculados, as dificuldades em reproduzir a doença no coelho, o quadro de sintomas e o período de incubação curto da infecção experimental, a ausência de agressividade na cobaia, a febre em curva difásica, — vinham confirmar o diagnóstico clínico. Em nossas primeiras publicações, em 1937 e em 1939, não insistimos mais no diagnósticos diferencial com a raiva porque a separação das duas doenças nos parecia constituir, nas nossas condições de trabalho, problema elementar de rotina

de clínica e de laboratório. Dezenas de materiais de raiva de bovinos, de equinos e cânincos passam, há varios anos, desde 1934, pelo nosso serviço no Instituto. Independentemente do diagnóstico clínico dos surtos epizoóticos, que é possivel, o diagnóstico de raiva no laboratório é de extrema simplicidade quando se dispõe de rotina e sobretudo depois que essa rotina se fixou na cobaia e no camondongo, com período de incubação bem mais curto, de 8-10-12 dias em geral, para o virus de rua. Apenas vale lembrar que em cérebro de cavalo e de muar os corpúsculos de Negri com maior frequencia não são encontrados, ou são mais raros, ou são pouco característicos. Os autores que examinam a frequencia de corpúsculos de Negri no cérebro das diversas espécies assinalam o fato, que tem sido de observação corrente em nosso laboratório. Mas, nesses casos, as inoculações de raiva são sempre bem sucedidas, mesmo com materiais de autópsias mais ou menos tardias, ou longamente conservados, á temperatura ambiente. Temos isolado, com frequência, o virus rábico em materiais enviados de Santa Catarina, do Rio Grande do Sul, de Mato Grosso e de outros fócos distantes, com permanência do virus durante cerca de seis dias à temperatura ambiente.

Além disso, embora os trabalhos de WEBSTER tenham introduzido, na rotina do diagnóstico experimental da raiva, o camondongo suiço albino como excelente reativo, e êste animal preste de fato serviço inestimavel, dada sua alta sensibilidade, usamos ainda, ao lado do camondongo, como animal de inoculação, a cobaia, quando há indicações ou suspeitas clínicas quanto á raiva. Nesse caso, quando se trata de raiva, a cobaia apresenta sintomas especiais de excitação e sobretudo de *agressividade,* muito característicos, inconfundiveis: passeia agitada pela gaiola, morde as companheiras ou qualquer objeto que lhe é apresentado. Êsse quadro afasta logo, com segurança, a encefalomielite. E, ainda, o cérebro dos animais inoculados, cobaias e camondongos, revela sempre abundância consideravel de corpúsculos de Negri, nítidos, sem possibilidade de confusão, em lâminas de esfregaços de corno de Ammon coradas pela técnica de Faraco, ou por outras. O período de incubação dos dois virus é ainda um elemento que facilita a separação.

Outras doenças do sistema nervoso central, de carater infeccioso ou tóxico, foram consideradas, como o botulismo e a intoxicação conhecida dos autores norteamericanos pelo nome de "corn-stalk disease". Em ambas um inquérito clínico inicial, realizado no fóco, orienta o diagnóstico. Além disso, o botulismo é afebril, de mucosas claras, tem quadro de sintomas onde dominam paralisias que se insta-

lam ràpidamente, e aspecto grave. A encefalomielite é febril, de mucosas congestionadas ou ictéricas; no seu quadro de sintomas dominam os encefálicos propriamente, com mortalidade mais baixa, em geral. Por outro lado a intoxicação pelo milho tem curso em geral crônico e deixa lesões graves, intensas e grosseiras: edema cerebral, hemorragias e zonas de necrose cerebral. E em nosos caso os cavalos não comiam milho, vivendo soltos nas pastagens. No estudo do diagnóstico clínico voltaremos a examinar os fatores de caracterização das epizootias de encefalomielite.

Em 1939, em relatório ao VI.º Congresso Americano de Ciências da Região do Pacífico, por solicitação do prof. K. F. MEYER, estudamos a doença no Brasil e insistimos na necessidade de caracterização clínica segura dos focos em nosso meio. Assinalamos que é possivel, apenas com o concurso de dados clínicos reunidos em um foco epizoótico, afastar confusões com outras doenças de quadro clínico em linhas gerais semelhante, mas não idêntico.

2 — ISOLAMENTO DO PRIMEIRO VIRUS BRASILEIRO

Realizada a caracterização clínica do foco que haviamos examinado, um virus foi isolado de cérebro de um cavalo, de sete autópsias realizadas no foco, e isolado com grande dificuldade depois de numerosas e repetidas inoculações em várias espécies animais e na maioria de resultados negativos. O isolamento do virus foi conseguido por inoculações intracerebrais realizadas na cobaia, matando em 5-6-8 dias nas primeiras inoculações, depois de um quadro clínico típico, precedido e acompanhado de febre, com apoio da cabeça contra a grade da gaiola, sonolência, tremores musculares generalizados, contraturas, paralisias, baba, queda e morte.

As primeiras passagens em cobaias foram ainda conseguidas com dificuldade, e em seguida passagens em série foram regularmente realizadas. Filtrações em velas Berkefeld N e W permitiram reproduzir a doença na cobaia e no camondongo, inoculados por via cerebral, com recuperação do virus dos cérebros desses animais. A conservação do virus no laboratório é em seguida realizada por passagens pelo cérebro de cobaias, a princípio mensalmente e depois de dois em dois meses; a amostra brasileira conta atualmente mais de 100 passagens e mata a cobaia regularmente em 2-3 dias.

Inoculações bem sucedidas, com passagens confirmadoras, foram obtidas no pombo, por via cerebral; o coelho se revelou bem resistente. No cavalo a infecção experimental foi realizada por via cerebral e por via venosa, com incubação de 2-4 dias, febre, quadro clínico típico das encefalomielites, semeaduras estereis de cérebro e recuperação do virus inoculado do sistema nervoso central dos casos de infecção experimental.

Além disso, em cérebro de casos de infecção natural e experimental foi verificada a presença do quadro histologico das encefalites infecciosas, com infiltração de células linfocitárias perivasculares e ausência de corpúsculos de Negri.

O conjunto dêsses dados e de numerosos outros nos quais parece desnecessário insistir, indicavam existir no País uma encefalomielite infecciosa do cavalo, que devia ser forçosamente relacionada com as encefalites americanas estudadas nos Estados Unidos e na Argentina.

*
* *

Depois de realizados esses primeiros estudos, as dificuldades de se alcançarem condições de relativa segurança necessárias ao prosseguimento dêste gênero de trabalho, foram muitas. Tratava-se, no caso, do estudo de uma doença grave, transmissivel com facilidade por diversas espécies de mosquitos e atingindo não só o cavalo como o homem. E as instalações de que dispunhamos não permitiam cuidados essenciais e indispensáveis de segurança. Além disso, a ausência de notificação de novos fócos bem caracterizados no Estado, e mesmo no País, não reclamava trabalhos urgentes no sentido de produção de vacinas. Essas causas retardaram a continuação dos estudos do assunto.

Mais tarde o problema pôde ser retomado e os resultados dessas novas investigações foram o objeto de novas publicações, realizadas em 1943 e 1944. O aspecto essencial do problema a investigar nessa segunda série de trabalhos deveria ser a comparação da amostra de virus aqui isolada, por meio de provas de imunidade cruzada, com os três tipos da literatura americana: o oéste, o leste e o venezuelano.

*
* *

Os três tipos de virus americanos da encefalomielite equina são imunologicamente distintos em face de todos os gêneros de provas cruzadas. Há uma absoluta especificidade imunológica não só do ponto de vista tissular como humoral. Um tipo não vacina contra os outros; e um trabalho essencial à profilaxia pela vacinação constitue a determinação de tipo de virus de cada região.

Era, pois, necessário conhecer a posição imunológica do virus brasileiro por meio de experiências da determinação de tipo de virus, trabalho que os autores norte-americanos vêm realizando no seu País e que vem sendo extendido aos outros países do Continente, o Canadá, a América Central, a Venezuela, a Colombia, a ilha de Trinidad, a Argentina e o Brasil.

Foram aqui realizadas experiências de imunidade tissular cruzada, usando-se duas técnicas de trabalho; e, em seguida, ainda experiências de sôro-neutralização cruzada. Examinaremos separadamente os dois tipos de imunidade sondados.

3 — EXPERIÊNCIAS DE IMUNIDADE TISSULAR CRUZADA

Para iniciar propriamente as experiências de imunidade tissular cruzada era necessário realizar, antes de tudo, uma série de ensaios preliminares para organizar uma rotina de trabalho. Esses ensaios preliminares eram mesmo indispensaveis e forneciam, já por si, dados muito importantes para melhor conhecimento do virus brasileiro. Assim foi necessário determinar a DLM do virus aqui isolado para a cobaia e para o camondongo, por via cerebral, estudar o seu comportamento por inoculações realizadas na membrana corioalantoide de embrião de pinto, determinar o teor de virus dessas culturas, realizar passagens por embrião, preparar vacinas formoladas de embrião de pinto, dosar a sua riqueza de virus e o seu valor antigênico. Era ainda necessário realizar numerosos outros ensaios preliminares idênticos, com os outros virus da literatura e usados para comparação, para dispôr então do material completo de rotina.

Nas experiências de imunidade tissular cruzada foram usadas duas técnicas de trabalho, de acôrdo com as indicações dos autores que têm estudado os tipos de virus.

Os primeiros estudos da amostra brasileira de virus pareciam indicar sua proximidade com o tipo oeste. Pela ação patogênica na cobaia, pelo período de incubação mais longo, de 4-5 dias, em vez de 2 dias, pelo poder infectante menos acentuado, pelo quadro de sintomas e pela evolução na cobaia, pela dificuldade em infectar o coelho, a amostra brasileira se aproximava mais do virus oeste e do argentino do que do virus leste, que é de incubação muito curta, 2 dias, de alto poder patogênico, de quadro de sintomas onde dominam contraturas e paralisias rápidas.

As primeiras inoculações que pudemos realizar com o virus argentino permitiram observar a infecção experimental na cobaia, cujo quadro se aproximava nitidamente do que se observava com o nosso virus. O período de incubação por via cerebral, com o virus argentino, é de 3-4 dias, e com o brasileiro era de 4-5 dias; o quadro de sintomas era idêntico nos dois casos. Já o virus leste típico dá um período de incubação bem mais curto, de 48 horas e mesmo 36 horas, em média; e a evolução da doença dada pelo tipo leste é sempre mais rápida, se processa em algumas horas, com um quadro mais grave, dando sobretudo contraturas violentas e paralisias. O virus brasileiro produzia evolução mais lenta, em 24-48 horas, com um quadro de ataxia locomotora e de paralisias flácidas que Howitt descreve no tipo oeste, dando um andar cambaleante, característico e troteado.

Do ponto de vista imunológico, no entanto, o virus brasileiro nenhuma relação apresenta com o tipo oeste, nem com o venezuelano, e coloca-se como uma variedade do tipo leste.

Nas experiências de imunidade tissular foram realizadas duas técnicas de trabalho para determinação de tipo.

1 — A primeira consistia em vacinar um lote, em geral de 12 cobaias, com vacinas formoladas de embrião de pinto, por meio de duas doses de 0,5 cc com intervalo de uma semana, com vacinas, por exemplo, do tipo oeste. Cerca de duas semanas depois da segunda dose vacinante, a prova de imunidade era realizada em seis cobaias com o virus oeste e nas seis outras com o virus brasileiro. Cobaias de contrôle, não vacinadas, são inoculadas no momento da prova de imunidade, com o virus oeste de um lado e com o virus brasileiro de outro lado.

Verifica-se assim que as vacinadas com o tipo oeste resistem à prova de infecção realizada com o mesmo tipo inoculado por via cerebral, e que as seis inoculadas com o virus brasileiro apresentam sintomas típicos e morrem do mesmo modo que os contrôles.

Vacina-se em seguida, ou ao mesmo tempo, um lote de 12 cobaias com vacinas do virus brasileiro. Realiza-se depois a prova de infecção com o virus brasileiro em seis cobaias e com o virus oeste nas outras seis. As inoculadas com o virus brasileiro por via cerebral resistem, enquanto as vacinadas com o virus brasileiro, quando recebem o virus oeste, morrem todas do mesmo que as cobaias de contrôle, não vacinadas.

Experiências do mesmo tipo são repetidas em ensaios cruzados do virus brasileiro com o virus venezuelano, e do virus brasileiro com o tipo leste.

2 — A segunda técnica consiste em vacinar um lote de 12 cobaias com vacinas de tipo oeste inoculadas por via subcutânea, em duas doses de 0,5 cc com intervalo de uma semana. Reforça-se em seguida a imunidade obtida pela vacina por via periférica, inoculando o mesmo virus por via cerebral. O lote de 12 cobaias, assim considerado solidamente imunizado, é dividido em dois: seis recebem de novo o mesmo virus oeste por via cerebral, e as seis outras o virus brasileiro. Idêntica sequência é realizada, nas mesmas condições, vacinando-se com o virus brasileiro por meio da vacina e virus, para depois infetar-se com o virus brasileiro e com o oeste.

As experiências são assim repetidas com o virus venezuelano e com o leste em face do virus brasileiro.

Essas duas técnicas de trabalho fornecem, em linhas gerais, resultados acordes e muito regulares no conjunto. Elas permitiram-nos concluir, de modo definitivo, pela ausência de relação imunológica do virus brasileiro com o tipo oeste e com o venezuelano.

No que se refere ao tipo leste, as relações imunológicas são muito nítidas, embora apareçam diferenças de valor antigênico entre as duas amostras, estudadas comparativamente. O virus leste protege regularmente contra o virus brasileiro; mas o virus brasileiro em geral não protege contra o tipo leste, ou quando o faz, oferece apenas proteção parcial ou incompleta. Essas diferenças parecem apenas quantitativas, mas são constantes e se verificam nas duas técnicas utilizadas de imunidade ativa cruzada.

4 — EXPERIÊNCIAS DE SORO-NEUTRALIZAÇÃO CRUZADA

Outra rotina de determinação de tipos de virus tem sido usada com resultados igualmente muito satisfatórios: é a que utiliza as provas de sôro-neutralização cruzada, que são, do mesmo modo, absolutamente específicas.

Durante alguns anos essas provas de sôro-neutralização na encefalite equina foram realizadas por inoculação das misturas virus-soro por via cerebral nas duas espécies mais sensiveis: a cobaia e o camondongo.

Os trabalhos de OLITSKY e HARFORD em 1938, vieram trazer ao assunto uma valiosa contribuição quando demonstraram a grande superioridade da técnica peritoneal no camondongo novo, de cerca de 16 dias de idade. A sensibilidade é assim cem ou mil vezes maior, e um soro dado como negativo pela primeira técnica pode revelar anticorpos neutralizantes quando examinado por via peritoneal. Nossas experiências foram realizadas por via peritoneal e, de fato, resultados muito nítidos são assim obtidos.

Os sôros neutralizantes, a princípio preparados por inoculação de virus ativo, podem ser obtidos com facilidade, sem os inconvenientes de trabalho com virus e sem os riscos de infecção de laboratório e de mortalidade as vezes elevada dos animais, durante período da imunização, por meio do virus inativado pelo formol. OLITSKY e MORGAN demonstraram que no coelho uma única série vacinante de três doses de 5 cc, separadas por intervalos de uma semana, fornece um excelente sôro. As experiências dos autores norte-americanos foram realizadas utilizando vacinas de cérebro de camondongo e as nossas utilizando vacinas de embrião de pinto, de títulos infectantes mais altos; com maiores razões uma excelente hiperimunização deviamos obter.

As experiências de sôro-neutralização cruzada consistiram em tratar a amostra brasileira em estudo por sôros hiperímunes obtidos da mesma amostra e ao mesmo tempo pelos sôros lestes e venezuelano. E, em seguida, em tratar as amostras típicas leste, oeste e venezuelano por sôros obtidos da amostra brasileira e por sôros oeste, leste, e venezuelano. A cada ensaio é sempre adicionada uma série de con-

trôles do valor neutralizante do sôro em presença da amostra respectiva, e uma série de contrôles de virus, em altas diluições, em presença de um sôro normal.

Essas provas de imunidade humoral cruzada forneceram conclusões essenciais:

Em primeiro lugar, mostraram ausência de qualquer relação imunológica do nosso virus com o tipo oeste ou com o venezuelano, o que confirma as experiências anteriores de imunidade ativa.

Em segundo lugar, no caso dos virus da encefalite equina, pode-se ver como êsse gênero de trabalhos é rigorosamente específico de tipos, pois não se pode, mesmo com soros de um tipo, de alto poder neutralizante e em altas doses, suspreender qualquer indício de neutralização de grupo em presença de um virus de outro tipo, mesmo em altas diluições. Essa especificidade absoluta do ponto de vista sorológico é muito importante e permite utilizar a técnica com confiança nos trabalhos de diagnóstico e nos estudos epidemiológicos em série.

Em terceiro lugar, estendemos assim no curso dêsses ensaios, a técnica de inoculação peritoneal das misturas ao virus brasileiro e ao tipo venezuelano, pois até então a rotina de OLITSKY e HARFORD havia sido apenas realizada com o tipo oeste e com o leste.

Finalmente, verifica-se que do ponto de vista da imunidade humoral não aparecem diferenças entre o virus leste típico e a amostra brasileira. Esta se comporta como um virus leste típico sem as diferenças do valor antigênico reveladas pelas provas de imunidade ativa: um sôro leste neutraliza sempre o virus brasileiro em todas as diluições ensaiadas, mesmo as mais baixas. Êste resultado nada tem de surpreendente em face das provas de imunidade tissular. Mas, além disso, um soro brasileiro neutraliza sempre o virus leste exatamente como se fosse um soro leste. Êste resultado tão uniforme não se poderia prever, ainda em face dos resultados das provas de imunidade ativa nas quais a vacina brasileira dificilmente portege contra o virus leste típico. Sorologicamente a amostra brasileira é, pois, um virus leste.

Assinalamos, além disso, como consequência de um ensaio comparado, que a técnica peritoneal no camondongo novo é mais sensivel que a técnica de inoculação das misturas na membrana corioalantoide de embrião de pinto.

5 — POSIÇÃO IMUNOLÓGICA DO VIRUS BRASILEIRO

O conjunto dêsses ensaios de sôro-neutralização cruzada, em confronto com as experiências de imunidade tissular cruzada, conduz a uma análise rápida do valor comparativo das duas técnicas e à conclusão sôbre a posição imunológica da amostra brasileira.

Os resultados das provas de sôro-neutralização, no entanto, não destroem os resultados nem as conclusões das provas de imunidade tissular, mais completas, jogando com outros fatores de imunidade que a técnica sorológica não permite surpreender. Pensamos, assim, que as diferenças de poder antigênico da amostra brasileira em relação ao virus leste típico devem prevalecer. A elas devem ser acrescentadas as diferenças constantes da ação patogênica verificadas na infecção experimental. O virus brasileiro deve ser classificado como uma variedade do tipo leste, uma vez que não lhe é totalmente idêntico.

6 — OUTROS ESTUDOS NO PAÍS

Os resultados dessas provas de sôro-neutralização estão de acôrdo com outros estudos no mesmo sentido realizados em outras regiões do País: LENNETTE e FOX encontram em sôros de cavalos de Peçanha, no Estado de Minas Gerais, anticorpos neutralizantes do virus leste, e CUNHA chega a resultados idênticos com sôros de cavalos do Nordeste brasileiro e isola mesmo, mais recentemente, a segunda amostra brasileira do virus da encefalite equina.

De março a setembro de 1946, identificamos quatro novos focos da doença em São Paulo, produzidos pelo tipo leste: um no município de Chavantes, outro no de Cafelândia, o terceiro em Mogiguassú e o quarto em Araraquara.

De Chavantes foram examinados 15 sôros, provenientes de cinco propriedades agrícolas, onde casos clínicos da doença ocorreram; dêsses 15 sôros, 8 fornecem resultados positivos, neutralizando cerca de 176.000 a 316.000 DLM peritoneais da amostra brasileira para o camondongo novo, segundo a técnica de OLITSKY e HARFORD.

De Cafelândia foram examinados 6 sôros, 4 dos quais mostraram-se positivos, neutralizando cerca de 100.000 DLM.

De Mogiguassú foram examinados 4 sôros, 2 dos quais revelaram-se positivos (300.000 DLM, peritoneais).

De Araraquara foram examinados 5 sôros, 4 dos quais positivos.

A identificação dêsses quatro novos surtos no Estado de São Paulo eleva assim a sete o número de focos da doença, seguramen-

te demonstrados, no País: o primeiro em São Paulo, 1937; o segundo em Minas Gerais, 1943; o terceiro no Nordeste Brasileiro, 1943; o quarto, o quinto, o sexto e o setimo em São Paulo, 1946.

Esses ensaios indicam, assim, a predominância, pelo menos atual, do tipo leste, no Brasil; do ponto de vista sorológico não é possivel determinar se existem diferenças de valor antigênico.

Uma vez que a prova sorológica não permite surpreender diferenças entre as amostras, diferenças que são assinaladas pelas provas de imunidade ativa, resta saber se predomina no País o tipo leste típico, com todas suas características: maior gravidade nas epizootias, maior ação patogênica, mais alta mortalidade na doença natural, ou se predomina uma variedade de tipo idêntica à que isolámos em São Paulo. Neste último caso, é inegavel que a classificação de uma variedade de tipo leste adquire um aspecto de maior importância.

O isolamento de novas amostras de virus no País e seu estudo completo pelas provas de imunidade tissular deverão, para o futuro, esclarecer essa questão, que não constitue detalhe secundário nem de interesse apenas experimental.

Se predominar o virus leste típico no País, com todas suas características patogênicas, imunológicas e de gravidade das epizootias, é necessário que a vacinação no campo seja realizada sempre com o virus leste.

Se predominarem no País amostras idênticas ao virus brasileiro a vacinação pode ser realizada, de preferência, com êste virus, que tem poder antigênico sólido, regular e duravel.

Como se vê, se as provas sorológicas têm inegavel interesse, contudo não devem substituir totalmente as provas de imunidade tissular, nem diminuir a grande utilidade destas.

A solução futura dessas questões só poderá ser fornecida pelo isolamento de novas amostras brasileiras e pelo seu estudo imunológico completo, do ponto de vista sorológico e tissular.

Além disso, convém não esquecer que as provas de sôro-neutralização só têm valor específico nas regiões onde as vacinações não foram ainda realizadas, e que estas começam a ser realizadas, embora em escala relativamente reduzida, em várias regiões do Brasil. É necessário que as provas de sôro-neutralização sejam consideradas como de valor específico de tipo de virus em efetivos que não foram vacinados.

Essas considerações mostram a atenção que deverão continuar merecendo o isolamento de novas amostras, a caracterização clínica segura dos focos específicos e o estudo completo, do ponto de vista imunológico, dos novos virus isolados.

Se considerarmos a enorme extensão do País, a existência do virus oeste na Argentina, e do venezuelano na Venezuela, na Colombia e na ilha de Trinidad, deve-se supor que existam entre nós os três tipos clássicos de virus da doença americana, dadas as largas faixas de fronteiras e as possibilidades de disseminação que se podem prever diante dos dados epidemiológicos recentes, acerca dos vectores e dos portadores de virus nas natureza. Os estudos futuros devem esclarecer êsse ponto, levantando o mapa completo dos tipos de virus no Brasil e no Continente.

Em várias outras regiões do País há suspeitas da presença da encefalomielite equina, mas ainda não se trouxeram provas seguras, nem de ordem clínica, nem de ordem experimental; novos estudos são pois necessários.

II — ESTUDO GERAL DO GRUPO DAS ENCEFALOMIELITES DOS EQUIDEOS

Estudaremos agora, no seu conjunto, o grupo das encefalomielites. No estudo dêste grupo importante de doenças, mesmo limitando-o aos equideos e à etiologia de virus, é necessário considerar de um lado a doença de MOUSSU e MARCHAND, muito pouco conhecida porque não tem sido mais assinalada, e a doença de Borna, dos autores alemães, como as duas doenças européas. De outro lado é necessário examinar separadamente a encefalomielite americana, com os seus três tipos de virus imunologicamente distintos. Muita confusão ainda se faz entre essas doenças, quando em realidade nenhuma relação existe entre a doença estudada pelos autores alemães e a americana. Vamos tentar nesta segunda parte um estudo geral do grupo, do ponto de vista histórico, e depois uma revista rápida das duas doenças européas.

1 — HISTÓRICO GERAL DO GRUPO

O histórico dêste grupo de doenças do cavalo pode ser seguido desde 1813, quando aparecem as primeiras referências à doença de Borna, na Alemanha. Resultam essas referências e essa denominação dada à doença, de um surto que grassou naquele ano, no efetivo de um quartel de cavalaria no distrito de Borna, na Saxonia. A primeira descrição se deve a WORTZ; e a doença volta a aparecer no mesmo

local e em outras regiões, no Wurtemberg, na Turingia, na Prússia, etc. Epizootias graves, com cerca de mil casos em cada uma, são assinaladas em 1896 e em 1897, na Saxonia.

É curioso verificar que, durante mais de um século, de 1813 a 1925, apenas se acumulam noções falsas quanto á etiologia, não só da doença de Borna, como das encefalites do cavalo em geral. De modo que se pode dividir o histórico do grupo em dois períodos: o velho período, de 1813 a 1922, e o período moderno, de 1922 até o momento atual. Do velho período histórico só resistiram à investigação moderna duas ordens de aquisições: de um lado ficaram as descrições clínicas, completadas no curso de sucessivas epizootias; de outro ficaram, sobretudo, como clássicas e fundamentais, as descrições histológicas, feitas de início por DEXLER, 1900, por OPPENHEIM, 1907, que já classificavam a doença como uma encefalite de tipo especial, uma meningo-encefalite linfocitária não purulenta, com acúmulo de células linfocitárias, perivasculares, e depois completadas pelos trabalhos de JOEST e DEGEN, 1909, que confirmam e completam os primeiros estudos histológicos e descrevem pela primeira vez as inclusões nucleares.

Em relação à etiologia, no entanto, os autores só acumulam achados falsos e mais ou menos idênticos, que se repetem em várias regiões, numa verdadeira corrida à prioridade de descoberta. São sempre os cocus, coraveis ou não pelo método de GRAM, os agentes responsabilizados; e as descrições variam conforme o agente infeccioso encontrado no material de autopsias. Mas em geral estudos expementais seguros não são realizados, nem a reprodução correta da doença em animais de laboratório ou no cavalo. As descrições dêsse tipo se repetem quase por toda parte.

2 — A DOENÇA DE MOUSSU E MARCHAND

A etiologia permanece assim ignorada ou discutida durante decênios, quando justamente na França, onde raramente se assinalava a doença, surge um surto estranho, circunscrito, mas de aspecto grave, matando 15 animais numa criação de alto valor, de cavalo puro sangue inglês. O estudo dêsse surto é empreendido por R. MOUSSU.

O autor francês reproduz a doença no coelho e depois no cavalo, por inoculações de emulsão de cérebro, realizadas na câmara anterior do olho; consegue ainda resultados no coelho, inoculando filtrados em velas Berkefeld; afasta a responsabilidade dos cocus, que devem ser considerados germes de infecções secundária; fixa os dados da infecção experimental no coelho; realiza passagens, conservação do virus em glicerina, e com MARCHAND faz o estudo histológico. O

primeiro trabalho de MOUSSU, assinalando reprodução da doença no coelho pela inoculação de filtrados, é de 1922, de modo que cabe a êsse autor a descoberta do primeiro virus nas encefalites especiais do cavalo. Seu trabalho apresenta lacunas: assim as inoculações de material virulento por via cerebral, de uso corrente na rotina, poderiam ter fornecido resultados mais seguros, e as inoculações na cobaia poderiam ter revelado relações ou diferenças definitivas com a doença americana. Foi no entanto o autor francês quem deslocou a etiologia do grupo de doenças para a direção dos virus, o que permitiu, daí por diante, novas descobertas.

3 — A DOENÇA DE BORNA

Pouco depois o assunto recebe novo impulso decisivo quando ZWICK, SEIFRIED e WITTE, 1925-1926, reproduzem a doença de Borna no coelho inoculado por via cerebral, demonstram a existência de um virus como agente etiológico, assinalam que a doença é diversa da que estudaram os autores franceses, realizam um estudo experimental completo no coelho, na cobaia, no macaco, no cavalo, e encontram as lesões gerais que vinham sendo descritas pelos histologistas alemães assim como as inclusões nucleares de JOEST e DEGEN.

ZWICK fala em virus como agente etiológico, sem querer ainda pronunciar-se de modo categórico, em 1925, e conclue em 1926 a demonstração definitiva nesse sentido, publicando com SEIFRIED e WITTE um longo e documentado trabalho experimental. A presença de um virus na doença é confirmada por ERNEST e HAHN; as relações da doença do cavalo com as encefalites do carneiro e do boi, são examinadas; estudos especiais sôbre o virus são realizados, e NICOLAU e GALLOWAY, que se ocupam da doença, a ela consagram uma série de notas, três memórias e uma excelente monografia.

4 — RELAÇÕES E DIFERENÇAS ENTRE AS DOENÇAS DO GRUPO

Quais as relações e as diferenças que se podem assinalar entre as duas doenças estudadas na Europa e as encefalites americanas? Nesse particular é que ainda se fazem muitas confusões. Vamos procurar esclarece-las.

1 — Em primeiro logar, muitas lacunas persistem ainda no que se refere ao conhecimento da doença de MOUSSU e MARCHAND. Ela não reapareceu na França e não pôde ser objeto de novos estudos que completassem os primeiros trabalhos. Perdeu-se, além disso, a única amostra isolada pelos autores franceses, que assim não pôde servir a estudos comparados de sensibilidade das diversas espécies

nem a trabalhos de imunidade cruzada. Ficou pois muito incompleto o estudo da doença. É inegavel, no entanto, que grosseiramente, e a julgar pelos elementos de comparação disponiveis, a doença francesa se aproxima, pelo período de incubação e pela evolução, mais da americana, do que da alemã. É possivel que se tenha realizado na França a importação do virus americano, em consequência da importação de cavalos durante a guerra de 1914, conforme sugeria MOUSSU, ou, pelo que se sabe hoje da epidemiologia, atravez de portadores ou de vectores. Mas de qualquer modo essa interpretação seria hoje obscura porque não explica a ausência de novos focos na Europa, devido à persistência do virus americano ou em consequência de novas importações. Os ensaios de autor francês foram feitos apenas no coelho e por uma via pouco severa, de modo que nada se sabe quanto á sensibilidade da cobaia.

2 — No que se refere à doença de Borna, melhor conhecida e estudada do ponto de vista experimental, as cousas são bem mais claras e definidas. Sob vários aspectos, é uma entidade mórbida autônoma, bem destacada, sem relação com as encefalites americanas. São numerosos os pontos de referência para uma separação completa. Assim:

a) O período de incubação, em média, na infecção experimental do coelho, é de cerca de 21-33- dias, em vez de 2-4, que é o dos virus americanos. NICOLAU e GALLOWAY, completando trabalhos dos autores alemães, publicam dados sôbre o período de incubação no coelho, onde se vêm claramente os limites extremos de 5 e 53 dias nas inoculações por via cerebral, sendo a média de três semanas.

b) A evolução da doença de Borna é igualmente mais lenta, quase crônica, alcançando na infecção experimental 5-10-15 dias, quando as encefalites americanas evoluem em horas ou em poucos dias.

c) É o coelho o animal mais indicado, como o mais sensivel, para o estudo da doença de Borna, enquanto as encefalites americanas encontram na cobaia e no camondongo branco as espécies eletivas para isolamento do virus, passagens em série, e para quase todo o estudo experimental.

d) As dimensões do virus da doença de Borna são de cerca de 80-100 mμ, quando os virus americanos têm de 20-30 mμ.

e) No estudo histológico da doença de Borna a presença das inclusões nucleares inconfundiveis é aceita e confirmadas pelos autores que reviram o assunto depois da descoberta, como ZWICK, SEIFRIED e WITTE e ainda ERNEST e HAHAN e principalmente NICOLAU e GALLOWAY. Na encefalomielite americana, embora inclusões nuclea-

res tenham sido descritas, a questão é ainda posta em dúvida e mesmo negada. A tendência parece ser, entre os histologistas, a de não aceitar as descrições de inclusões. TYZZER e SELLARDS, em 1941, acham que se encontram estruturas intranucleares que devem ser interpretadas como substância nuclear modificada, e outras alterações nucleares, mas nada de especialmente significativo ou de ocurrência constante. No entanto outros autores descreveram inclusões, no estudo histológico de material nervoso.

f) Finalmente, não há imunidade cruzada entre o virus da doença alemã e os virus americanos, conforme HOWITT e MEYER em 1934.

O nome de doença de Borna deve ficar assim reservado para indicar a doença especial à Alemanha e não deve ser generalizado às encefalites americanas.

Não seria possivel, sem alongar demais o presente trabalho, entrar aqui no estudo especial da doença de Moussu nem, muito menos, da doença de Borna, que tem extensa literatura, condensada em monografias de ZWICK, SEIFRIED e WITTE, 1926, NICOLAU e GALLOAY, 1928-1930, e ZWICK, 1939, ou estudada em HUTYRA, MAREK e MANNINGER, 1938.

III — A ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DOS EQUIDEOS NA AMÉRICA

1 — HISTÓRICO

Como se verá, a doença na América é muito mais importante pela extensão, pelos prejuizos que tem ocasionado no curso de longos anos, pelo duplo aspecto da doença equina e humana e ainda pela soma importante de aquisições fundamentais incorporadas ao assunto nesses últimos anos.

Epizootias extensas, que realisaram graves devastações em vários estados norte-americanos, são assinaladas desde meados do século passado. As primeiras referências se encontram em LARGE, em 1847, e como aconteceu na Europa, durante decênios estudos etiológicos sem base experimental segura, se repetem. As epizootias de 1847 em Long Island e em New York, confrontadas com as descrições atuais, eram certamente de encefalite infecciosa e não tóxica. Em seguida, MICHNER, 1850, LIAUTARD, 1869, WILLIAMS, 1897, UDALL,

KINSLEY, MOHLER descrevem, em estados do leste e do oeste, epizootias de uma doença febril, com distúrbios locomotores, paralísias, alta letalidade, evolução em torno de um a quatro dias. Surtos graves se assinalam no Texas em 1882 e em 1897, matando milhares de cavalos. Em North Carolina, em 1902, há cerca de 600 casos, e a doença aparece ainda, em 1906-1907, em Louisiana. A epizootia de 1930 em San Joaquin Valley, na California, de onde surgiu o primeiro virus americano, havia-se manifestado no mesmo local em 1892.

Em 1912 chegam ao Bureau de Indústria Animal de Washington relatos de desesseis estados atingidos; a maior distribuição da doença deve ter sido então verificada. Os prejuizos mais consideraveis situavam-se na parte central e oeste de Kansas e Nebraska, onde se calcula a mortalidade em cerca de 35.000 equideos. Novas epizootias se assinalam em vários estados em 1915-1919-1920.

Em 1900 uma doença do cavalo, produzida pela alimentação com silagem mofada, é estudada por PEARSON. Esta doença fica limitada à ocurrência de sete casos, sendo cinco fatais. Administrando a forragem tóxica, o quadro da doença é reproduzido no cavalo. Os sintomas principais consistiam em tremores, paralisia faringeana, paralisias generalizadas, mas sintomas propriamente cerebrais não foram observados. Em torno dêste fato isolado vai girar durante longos anos um grave engano. O acidente inicial examinado por PEARSON e as verificações que o acompanharam são ampliados sem razão; e o nome de intoxicação forrageira, em detrimento do progresso futuro do assunto, passa a encerrar a verdade quanto á etiologia das epizootias anteriores e posteriores de encefalomielite. A generalização era apressada e improcedente, e veiu concorrer para retardar o achado da verdadeira etiologia. Durante longos anos a expressão "intoxicação forrageira" passa a ser aceita sem maiores discussões para indicar a causa da doença, a-pesar-de dados clínicos e experimentais não permitirem a aceitação dessas ideias. MEYER e colaboradores, revendo o assunto, assinalam que era necessário fixar para o botulismo e a intoxicação forrageira apenas os casos em que era possivel estabelecer relação inseparavel entre o aparecimento da doença e a presença de antecedentes do ponto de vista alimentar. No botulismo, estudado na África do Sul por THEILER e colaboradores, o quadro clínico não se superpõe ao que a literatura americana assinalava nas graves epizootias: sintomas de sonolência, letargia, incoordenação locomotora, conjuntivas congestionadas ou ictéricas, febre, pulso acelerado, não pertencem ao quadro clínico do botulismo. Além disso, UDALL, KINSLEY, MOHLER descrevem, em trabalhos anteriores

à descoberta do virus, lesões do sistema nervoso central e de vários órgãos, que estão ausentes no botulismo.

Outros fatos essenciais e novos argumentos fixavam diferenças definitivas entre a doença americana e o botulismo. A ocurrência dêste, em surtos norte-americanos, foi apenas sugerida, mas não provada, em quatro ou cinco ocasiões diversas. O simples isolamento do agente etiológico do botulismo do solo é invalidado pela distribuição ubiquitária do germe; e a presença da toxina botulínica não foi demonstrada nos alimentos responsabilizados pelo aparecimento da doença. Casos disseminados de uma doença de sintomas nervosos, sucedendo-se em série, em carater epizoótico, durante os meses quentes, são dados por uma doença infecciosa e não pela intoxicação botulínica.

As investigações realizadas nestes últimos anos a partir de 1931, mostrando larga distribuição do virus, demonstram agora, de modo definitivo, que essas indicações continham toda a verdade e fixavam, mesmo, as linhas essenciais do diagnóstico clínico dos surtos de encefalomielite. Além disso, nas graves epizootias de 1912 UDALL, baseado em dados clínicos e histológicos, considerava inaceitavel o diagnóstico de botulismo e aproximava a doença americana da alemã, cujo estudo clínico e histológico era já melhor conhecido. Essa indicação importante, que se orientava para o lado da verdadeira etiologia, perdeu-se, dominando até 1930 a teoria da origem alimentar.

Esta síntese dos curiosos aspectos históricos da doença, em que direções falsas são seguidas durante longos anos, é muito instrutiva sob vários aspectos. Em várias doenças de virus neurotrópicos, fatos idênticos se repetem. O conhecimento dêsses enganos relativos à etiologia foi-nos de inestimavel concurso quando examinamos, em 1937, o foco brasileiro. Era impressionante, no caso, a concordância de dados clínicos com o que relatava a literatura norte-americana. E o diagnóstico de encefalomielite infecciosa se impunha sem hesitações.

2 — DESCOBERTA DO VIRUS AMERICANO

Em 1930 as cousas tomam nova direção quando MEYER, HARING e HOWITT estudam um surto da doença surgido em San Joaquin Valley, na California. Só nesse foco morrem cerca de 3.000 equideos, de 6.000 que adoecem. Por inoculações na cobaia, realizadas por via intracerebral, isolam esses autores o primeiro virus americano de encefalomielite, com um período de incubação inicial de 4-6 dias, com presença de febre, viremia, anticorpos neutralizantes do virus no sôro sanguíneo de algumas espécies que vencem a infecção; assinalam a

maior resistência do coelho, reproduzem a doença no cavalo, realizam provas de filtração e relatam as lesões gerais das encefalomielites infecciosas.

3 — DESENVOLVIMENTO ATUAL DO ASSUNTO

Em uma doença grave e devastadora, muito disseminada por várias regiões do País e causando estragos há quase um século, a descoberta era revolucionária, sensacional, e de fato teve larga repercussão. Foi além disso o ponto de partida de numerosas outras descobertas importantes, surgidas nestes últimos quinze anos. Seria mesmo difícil encontrar outro exemplo, em patologia de doenças infecciosas, de doença mais amplamente estudada em curto espaço de tempo e com resultados mais brilhantes no conjunto. Quase todos os aspectos que era necessário esclarecer foram investigados e as soluções importantes que o laboratório veiu fornecendo foram sendo deslocadas para o dominio aplicado.

Sucederam-se assim, a curtos intervalos, estudos e descobertas importantes neste capítulo:

1 — dualidade dos virus americanos, em 1933, e depois pluralidade dos tipos, do ponto imunológico, estudadas por técnicas diversas, de resultados acordes;

2 — conhecimento mais completo da área geográfica nos Estados Unidos e no Continente; da extensão dos prejuizos e da distribuição dos três tipos de virus;

3 — revisão completa do estudo clínico; estudo da patologia e da histologia;

4 — descoberta do papel importante que os mosquitos devem desempenhar na epidemiologia;

5 — estudo do virus no laboratório em tôdas os aspectos e em numerosas espécies animais;

6 — estudo da existência de portadores entre mamíferos domésticos e selvagens e entre as aves;

7 — ensaios de transmissão experimental por carrapatos;

8 — aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico experimental pelo isolamento do virus do cérebro, do sangue, e pelas provas sorológicas;

9 — estudo da soroterapia e sobretudo da vacinação com culturas do virus em embrião de pinto e preparo de uma vacina de alto valor;

10 — vacinações extensivas, que somente nos Estados Unidos e em cinco anos, atingiram cerca de sete milhões de equideos;

11 — verificação de epidemias humanas;

12 — estudos especiais de purificação do virus;

13 — verificação de epizootias em aves;

14 — isolamento do virus de aves, de mamíferos e, diretamente, de mosquitos naturalmente infectados, e do *Dermanyssus gallinae*.

Em cada um dêsses aspectos o problema foi examinado e não raro exaustivamente estudado. E em numerosos outros países ou regiões do Continente: Canadá, Panamá, Cuba, Argentina, Brasil, Venezuela, Colombia, México, Ilha de Trinidad, Equador, a doença está identificada e o tipo de virus determinado.

A rápida enumeração das etapas vencidas mostra a extensão atual do assunto e a impossibilidade do seu estudo completo. Vamos procurar condensar o essencial.

4 — PLURALIDADE DOS VIRUS AMERICANOS

Pouco depois do trabalho fundamental de MEYER e colaboradores, em 1931, surtos mais graves, de mais alta letalidade, surgem em estados americanos da costa do Atlântico, em Delaware, Maryland, Virginia, em julho, agôsto e setembro de 1933; várias amostras de virus são isoladas. A doença tem curso mais agudo e deixa lesões mais intensas. TEN BROECK e MERRILL de um lado, GILTNER e SHAHAN de outro, trabalhando independentemente, demonstram que as amostras isoladas das epizootias da costa leste eram imunologicamente diversas das que haviam sido isoladas na costa do Pacífico.

Essa verificação tinha um duplo interesse: de um lado surgia aí uma dualidade de tipo, semelhante, em linhas gerais, à que VALLÉE havia assinalado na febre aftosa; de outro, a nova descoberta reclamaria soluções novas do ponto de vista aplicado pois um tipo não vacina contra o outro. Era necessário realizar, o que vem sendo feito nos Estados Unidos e nos outros países da América, a determinação do tipo de virus de cada região, para realizar a vacinação por meio da vacina correspondente, ou, em alguns casos, para realizar vacinações mistas.

Em 1938, em epizootias semelhantes examinadas na Venezuela, BECK e WYCKOFF isolam um terceiro tipo de virus, assim classificado de acôrdo com os trabalhos de KUBES e DIAMANTE.

5 — DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Pela extensão das epizootias, a doença tem consideravel importância econômica não só nos Estados Unidos como nos outros países do Continente, à medida que conhecimentos da sua distribuição vão

sendo reunidos. Como vimos anteriormente, extensas e graves ondas epizoóticas atravessaram os Estados Unidos nos oitenta anos que precederam à descoberta de virus. Depois que a etiologia foi esclarecida a extensão dos surtos vem sendo melhor conhecida e as estatísticas mais recentes e mais bem documentadas, depois que o Bureau de Indústria Animal começou a reunir dados especiais, mostram a extensão atual. Assim o número anual de casos, de 1935 a 1943, é o seguinte:

1935	23.512
1936	3.929
1937	173.888
1938	184.662
1939	8.008
1940	16.941
1941	36.872
1942	4.939
1943	4.768

Em 1943, em 4.768 casos notificados, 1.622 foram fatais: cerca de 30% de mortalidade. Só nos Estados Unidos, de 1935 a 1941, foram assim notificados 447.813 casos, e de 1930 a 1941 calcula-se em um milhão de equideos, pelo menos, o número de animais atingidos. A doença ocorre em cerca de 35 estados, sendo o virus oeste dominante quanto á área de extensão em território norte-americano. A população de equideos era alí calculada, em 1932, em cerca de 14 milhões, e por aí se pode avaliar o vulto dos prejuizos renovados no curso de anos.

A mortalidade é variavel com a gravidade das epizootias e de acôrdo com o tipo de virus. De modo geral, o tipo oeste fornece um índice de letalidade mais baixo, cerca de 25-40%; o virus leste pode ocasionar mortalidade de cerca de 70-80% do efetivo que adoece. Mas um grande número dos que sobrevivem conserva defeitos irreparaveis: ataxia locomotora, distúrbios de visão e outras sequelas que inutilizam de modo definitivo.

Distribuição geográfica dos tipos de virus — O mapa de distribuição dos tipos de virus nos Estados Unidos, até março de 1943, mostrava o tipo oeste em 18 estados, o leste em 13, e os dois tipos, em três estados: Alabama, Michigan e Texas. Em 17 estados o tipo de virus ainda não havia sido determinado, e em três: Pennsylvania, Tennessee e West Virginia, a doença não se verifica desde 1935.

No Canadá e no Panamá foi isolado o tipo leste; na Argentina o virus é de tipo oeste, conforme estudos de ROSENBUSCH confirmados por MEYER e HOWITT. Na Venezuela, na Colombia e na ilha de

Trinidad se encontra o terceiro tipo imunológico do grupo — o virus venezuelano.

O virus foi isolado não só do cavalo, como do homem, do faisão, de algumas outras aves, de mosquitos como *Culex tarsalis* e mais recentemente de um parasita de aves, o *Dermanyssus gallinae*, além de algumas outras espécies domésticos e selvagens. Além disso, como veremos, a prova de anticorpos neutralizantes no sôro sanguíneo de numerosas espécies animais, realizada de modo extensivo em estudos epidemiológicos, mostra alta incidência da infecção em certas espécies e uma longa faixa da distribuição do virus nas diversas e numerosas espécies sondadas: mamíferos e aves, domésticos e selvagens.

6 — ESTUDO CLÍNICO

A doença é especial aos equideos, cavalo e burro, nas condições naturais, não sendo atingidos os bovinos. Epizootias têm sido estudadas em aves, no faisão sobretudo. Além disso, como veremos mais adiante, epidemias se verificaram nos Estados Unidos e no Canadá.

No quadro clínico podem-se assinalar três fases:

1.º — período inicial de invasão;

2.º — período de caracterização clínica definida;

3.º — período final.

Nos casos isolados o diagnóstico clínico torna-se dificil e quase sempre só o laboratório pode decidir com segurança. Mas nos casos em série, nos surtos epizoóticos, o diagnóstico clínico do foco pode ser fixado com segurança e confirmado pelo laboratório.

1 — O primeiro período pode passar despercebido: o animal nada apresenta de muito característico e revela indisposição mais ou menos acentuada, indefinida, inapetência, elevação têrmica, às vezes ligeira sonolência, mucosas ligeiramente congestionadas ou ictéricas, pêlos arrepiados e mesmo um estado de ligeira excitação. É o período de invasão, que coincide com o período de virus no sangue, que se observa no cavalo e no homem e que se reproduz com facilidade na infecção experimental.

2 — O período de caracterização clínica bem definida pode revelar toda uma série de sintomas: sonolência, tendência do animal para aumentar a base de apoio, mantendo os membros afastados. Pode haver ainda febre, que volta a manifestar-se, inapetência completa ou apenas incapacidade para apreensão, mastigação ou deglutição, em consequência de paralisias. A deglutição de líquidos torna-se dificil ou impossivel e a água de bebida corre pelas narinas quando o animal tenta engulir. Do mesmo modo pode haver descarga alimentar

pelas narinas, como resultado de retenção no faringe e falso trajeto. Frequentemente ha bocejos, rangidos de dentes, tremores musculares, paralisias dos maxilares, dos lábios, da língua. Vários grupos musculares da região cervical, da espádua e de outras regiões podem revelar tremores e paralisias e depois uma hipertonia intensa e generalizada. O animal mostra-se sonolento, sem a vivacidade habitual, como estúpido, a cabeça baixa, apoiada em atitude de extrema depressão.

Há tendência para movimentos de recúo, movimentos laterais, andar em roda; observa-se ainda tendência para locomover-se sem direção, andar torcido, corpo inclinado em atitudes anormais, como tonto; distúrbios da visão. Alguns doentes ficam muito rígidos imoveis, outros apresentam excitação muito intensa, tornam-se intrataveis, batendo a cabeça, recusando o cabresto, ou forçando e resistindo quando puxados.

3 — Na última fase sobrevém a queda em paralísias mais ou menos generalizadas; o animal não se mantém mais de pé, a cabeça é fortemente forçada contra o solo, em posições anormais e penosas; um estado de intensa hipertonia muscular domina, com dispnéa, até que a morte sobrevém, quasi sempre em período de hipotermia.

Convém ainda lembrar que durante a segunda fase podem ocorrer verdadeiros acessos durante os quais o animal se projeta sôbre obstáculos, quebrando cercas, andando longas distâncias como louco, batendo-se contra paredes e cercas; como consequência escaras se formam e fraturas podem ocorrer.

Não é possivel nem necessário fornecer uma longa descrição do quadro clínico. Detalhes de observações de casos completos da doença natural e experimental constam de nosso primeiro trabalho, e toda a rica sintomatologia nervosa que a doença pode apresentar, com repercussão nas mais variadas funções, é descrita nos tratados de patologia.

Em resumo, clinicamente a doença se caracteriza pelo seguinte conjunto:

1 — Doença febril, precedendo a febre, em geral, o aparecimento dos sintomas gerais e voltando a manifestar-se depois que esses sintomas se instalaram. Febre, pois, em curva difásica.

2 — Sintomas característicos e acentuados de uma encefalomielite: ataxia locomotora, hipertonia muscular generalizada, cabeça fortemente apoiada, pescoço torcido, membros afastados, andar cambaleante para frente, para traz ou em círculo, distúrbios respiratórios e da visão.

3 — Paralisias finais mais ou menos generalizadas, com emagrecimento mais ou menos rápido, queda e morte.

A evolução pode ser variavel de acôrdo com as formas clínicas. Podem ocorrer casos classificados como de formas bulbares, de evolução rápida. Mas, em geral, a evolução se faz em 1-2 dias nos casos agudos, em cerca de 3-4 dias nos casos menos agudos, ou ainda em uma ou duas semanas nos casos mais lentos. Passado o período de invasão e de instalação da doença e de desenvolvimento das lesões que o processo infeccioso instala, sequelas crônicas persistem, ou se agravam ou regridem, e essa fase da evolução pode prolongar-se por períodos mais ou menos longos.

7 — DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico seguro nos *casos isolados* não é facil e pode levar a confusões com doenças de quadro clínico semelhante, específicas ou não, como a raiva, as intoxicações seguidas de comprometimento do sistema nervoso central, as hemorragias e tromboses cerebrais, etc., principalmente quando não é possivel acompanhar o início e o desenvolvimento do quadro clínico.

Mas o diagnóstico clínico das epizootias pode ser fixado com segurança nos casos em série, quando se considera o conjunto de fatores que julgamos essenciais à caracterização clínica dos fócos:

a — A doença tem carater infeccioso, surgindo em vários logares, em pleno verão, de preferência, sem que se possa responsabilizar, em um inquérito local, um fator alimentar ou outro fator etiológico preciso.

b — É especial dos equideos: cavalo e burro, não sendo atingidos os bovinos, ovinos, caprinos e suinos.

c — Apresenta-se com o carater de doença febril, com uma primeira ascenção termica inicial e nova elevação depois que sintomas típicos se instalaram.

d — Apresenta um conjunto de sintomas de uma encefalomielite que descrevemos e que, vistos em uma série de casos, tornam-se inconfundiveis.

e — A presença de casos curados e de casos curados com sequelas, orienta ainda o diagnóstico.

Diagnóstico de laboratório — Pode ser fixado por meio de três técnicas de trabalho:

1 — Pela necropsia e isolamento do virus do cérebro dos que sucumbem à infecção. Neste caso, em presença de um surto epizoótico, é importante que não se percam autopsias, porque o isolamento do

virus na infecção natural não se realiza em tôdos os casos; é necessário contar com resultados negativos ligados às condições de trabalho em veterinária, grandes distâncias, autópsias em más condições ou tardias, destruição do virus à temperatura ambiente, longa conservação do material colhido, fora da geladeira, existência de zonas avirulentas no sistema nervoso central, infecções mortais autoesterilizadas, dificuldades iniciais de adaptação de certas amostras aos animais de laboratório.

Para fugir às causas de insucesso algumas indicações devem ser fornecidas. Assim, o material de cérebro deve ser colhido em pequenos blocos de substância nervosa cortados em várias zonas, sem esquecer as que são consideradas eletivas nas doenças de virus do sistema nervoso, como sejam o corno de Ammon, o bulho, que permitem eliminar o diagnóstico da raiva. O material colocado em glicerina fosfatada de PH 7.2, ou em glicerina pura, neutra, bidistilada, deve ser guardado de preferência na geladeira até o momento da expedição ou até alcançar o laboratório. Além disso, o sacrifício dos animais quando caidos, para efeito de necrópsia, quando fôr possivel realizá-lo, deve ser preferido à morte natural, ás vezes tardia. Parece indicado o sacrifício pela sangria, assegurando um material nervoso mais livre de sangue.

2 — O diagnóstico de laboratório pode ser ainda fixado, embora nem sempre os resultados sejam positivos, pelo isolamento do virus do sangue ou do sôro sanguíneo, por meio de sangrias realizadas durante o período febril que coincide com o período de virus no sangue. Resultados positivos têm sido alcançados no homem, e mais raramente no cavalo.

3 — Além disso, o diagnóstico retrospetivo dos focos, ou mesmo de casos isolados, pode ser realizado pela pesquisa de anticorpos neutralizantes no sôro sanguíneo, praticada em uma série de animais no foco quando a vacinação não foi ainda realizada. Para êsse fim as sangrias podem ser realizadas em animais curados que revelam ainda sequelas, em animais que sararam completamente de uma infecção típica e mesmo em animais que nada revelaram. A experiência de inquéritos epidemiológicos tem mostrado certo índice mais ou menos elevado de sôros positivos em regiões onde a doença é endemica. Esta prova tende, para o futuro, a se generalizar, do mesmo modo que a prova de sôro-proteção na febre amarela. Ela tem sido mesmo largamente utilisada pelos autores norte-americanos em estudos epidemiológicos seriados, atingindo numerosas espécies domésticas e selvagens de mamíferos e aves. Em um inquérito reali-

zado em 87 sôros de equideos provenientes de várias zonas do Estado, encontramos recentemente em 15 sôros de Chavantes, 8 positivos para tipo leste, em seis sôros de Baurú, 4 resultados positivos, em 4 sôros de Mogiguassú, 2 positivos, e em 5 sôros de Araraquara, 4 positivos.

A prova de sôro-neutralização é rigorosamente específica de tipo. Realizada a princípio e durante vários anos por inoculação das misturas por via cerebral, esta prova deve ser praticada de preferência, por inoculações no camondongo novo e por via peritoneal, segundo a técnica de OLITSKY e HARFORD, que é muito mais sensivel e mais segura. Baseados em verificações da menor resistência do camondongo novo à inoculação intraperitoneal do virus, por ausência de barreiras de proteção natural, que se desenvolvem com a idade, esses autores inoculam o camondongo suiço de cerca de 15-17 dias, com 0,1 cc das misturas virus-sôro. Estudam ainda, no caso da encefalite equina, a existência do fenômeno de Andrews e Todd, que concerne à diferença de comportamento das misturas virus-sôro de acôrdo com a via de inoculação utilizada: um sôro pode ser negativo por via cerebral e positivo ou mesmo de alto título neutralizante quando a inoculação das misturas é realizada por via peritoneal. Em trabalho anterior estudamos em detalhe a técnica de OLITSKY e HARFORD, utilisada com excelentes resultados em experiências de imunidade cruzada, confirmando suas reais vantagens e extendendo sua aplicação à amostra brasileira e ao tipo venezuelano. Com o virus oeste, no entanto, nem sempre resultados muito satisfatório são obtidos.

8 — ENGANOS DE DIAGNÓSTICO

Acabamos de ver, em linhas gerais, que a clínica e o laboratório dispõem hoje de meios seguros de caracterização de um foco de encefalomielite e, em seguida, de confirmação do diagnóstico clínico pelo isolamento do virus e determinação do tipo. Apesar disso, erros de diagnóstico ainda se verificaram ou podem verificar-se quando a literatura fundamental do assunto é deixada de lado, ou quando se considera o problema de modo mais simples do que convem.

Dois exemplos de confusões acerca do diagnóstico da encefalite equina, são curiosos e devem ser recordados. Eles ficaram durante algum tempo na literatura:

1 — Em 1933-1934, VICKELESKY e colaboradores isolam de cérebro de cavalo, na Russia, um virus que parecia de encefalite equina. Êsse virus é mandado mais tarde a HOWITT, trabalhando no

laboratório de MEYER, onde é claro, se conhecia muito bem o problema das encefalomielites.

Sem conhecimento dos aspectos clínicos especiais que devem ter cercado a ocurrência das epizootias da Russia, HOWITT admite que se trata de um virus de encefalomielite equina e inclue a nova amostra nos seus estudos comparados empreendidos com numerosas outras amostras americanas, em um trabalho de ordem geral: sintomas, curva termica, sensibilidade das diversas espécies e por diversas vias, DLM das amostras, resistência às variações do pH, etc., são examinados para as diversas amostras comparadas. A autora americana considera assim que o virus russo é um tanto especial, diverso dos virus americanos e do virus de Borna. Inclusões plasmáticas são referidas no exame histológico do virus russo, sem que sôbre êsse detalhe se fixe de modo especial a atenção. Mais tarde, em 1935, HOWITT realiza um belo estudo comparado de treze amostras de virus da encefalite examinadas do ponto de vista imunológico. Ainda nessas experiências a amostra russa se destaca completamente dos outros virus. Só em 1941 um estudo comparado com o virus rábico esclarece as cousas e revela a surpresa: o virus russo era apenas um virus rábico e as inclusões eram corpúsculos de Negri.

Revendo o trabalho dos autores russos, poder-se-ia chegar, *a priori* a essa conclusão, ou pelo menos a uma séria suposição quanto á raiva: um dos vários virus isolados na Russia era neutralizado pelo sôro antirrábico e êste detalhe relatado pelos autores russos, era por nós assinalado em 1936, em uma revista das epizootias de raiva.

2 — Aquí no Brasil houve outro engano, ocorrido na Baía: um virus é isolado de cérebro de burro e mata a cobaia inoculada por via cerebral em 10-12 dias nas primeiras passagens e depois em 7 dias, com sintomas de agitação e agressividade. A rotina de trabalho mostra que com o virus da encefalite equina nunca esses sintomas se verificam; e por outro lado, a rotina de isolamento dos virus rábicos nos tem mostrado que a agitação e a agressividade na cobaia inoculada são típicas do virus rábico de rua. Em face dêsse detalhe se exclue a encefalomielite experimental. E de fato as suspeitas deviam orientar-se para o virus rábico no foco da Baía. CUNHA, examinando o virus baiano por experiências de imunidade cruzada, demonstra que se trata, ainda aí, de um virus rábico.

Julgamos interessante relatar aquí êsses erros de diagnóstico para chamar a atenção para a importância de certos aspectos fundamentais que permitem, quando considerados, evitar com segurança a sua repetição. No diagnóstico clínico das epizootias, pode-se com

segurança, em um inquérito clínico cuidadoso, separar nitidamente as duas doenças pelos fatores de caracterização das epizootias de encefalite. Mas, ainda quando o erro de diagnóstico clínico tenha sido realizado, o laboratório pode com segurança e com relativa facilidade corrigí-lo; há até todo um conjunto de elementos nos quais pode basear-se um diagnóstico experimental definitivo: na raiva experimental os corpúsculos de Negri, a sintomatologia especial da cobaia e a incubação orientam logo. Na encefalomielite há ainda a considerar a extrema facilidade de cultura do virus por inoculação na membrana coriolantoide de embrião de pinto, com lesões características e rápido efeito letal sôbre o embrião.

Nos casos especiais, as provas imunológicas resolvem de modo definitivo.

9 — ISOLAMENTO DO VIRUS

O isolamento do virus da encefalomielite é realizado por inoculações intracerebrais na cobaia ou no camondongo. Usando a cobaia devem ser preferidos animais novos, de 250-300 grs. de peso. Utilizando o camondongo suiço albino, amostra selecionada no Instituto Rockefeller, pode-se usar a via intracerebral, com 0,03 cc em seguida à anestesia pelo eter, no adulto, ou a via intraperitoneal no camondongo novo, com 0,1 cc, técnica que é preferida por HAMMON e colaboradores nos seus ensaios seriados de isolamento de virus de mosquitos. Uma excelente técnica, que pode prestar reais serviços, consiste na inoculação do material suspeito diretamente na membrana corioalantoide de embrião de pinto. Cuidados especiais recebem às vezes os materiais suspeitos, de acôrdo com as condições de sua colheita, antes de ser realizada a inoculação, como centrifugação, filtração em velas, para remoção de impurezas grosseiras ou germes de contaminação.

Quando um virus isolado de cérebro de cavalo mata a cobaia em 10-15 dias, com sintomas de excitação, agressividade e fúria, o diagnóstico deve ser de raiva: a pesquisa de corpúsculos de Negri confirmá-o logo. Pode acontecer que o material original de cavalo ou de burro, como assinalámos, não revele corpúsculos típicos; mas o material de infecção experimental em cobaia ou em camondongo, na primeira ou na segunda passagem, revela-os típicos, em abundância e afasta toda dúvida.

Os tratadistas e alguns autores especializados falam em virus rábicos anegrígenos. Parece que em realidade um virus rábico totalmente anegrígeno não existe, embora não tenhamos estudo especial

dêsse ponto. Em numerosos isolamentos de virus tem-nos acontecido encontrar, às vezes, virus rábicos que, pela pesquisa de corpúsculos, fornecem resultados negativos no material original e mesmo na primeira passagem em cobaia. Mas a segunda passagem revela logo corpúsculos de Negri numerosos e típicos. Uma única vez isolámos um virus que forneceu sempre resultados negativos na cobaia e apenas corpúsculos positivos na terceira e quarta passagem no camondongo, com incubação de 8 dias. É claro que em casos muito especiais a dificuldade pode existir, mas há sempre um conjunto de fatores a facilitar o julgamento e, em última instância, há as provas de imunidade cruzada.

Isolado um virus de encefalomielite, por outro lado, a inoculação em embrião de pinto pode fornecer logo uma indicação complementar, preciosa e rápida, considerando os caracteres especiais dos virus de encefalite assim inoculados: rapidamente provocam diminuição dos movimentos do embrião, congestão e trombose dos vasos, efeito letal sôbre o embrião que, à abertura dos óvos inoculados, se mostram hemorrágicos e cianóticos.

O triturado de embriões diluido em água fisiológica e centrifugado a 2.500 r.p.m durante 10 minutos, é em seguida infectante para o camondongo e para a cobaia até as diluições de lp. 10.000.000 — lp. 100.000.000 e mesmo lp. 1.000.000.000, em inoculações intracerebrais. E os virus da encefalomielite matam a cobaia e o camondongo inoculado por via cerebral com um período de inocubação sempre muito curto, de cerca de dois dias para o tipo leste e para o venezuelano e de 3-4-5 dias para o tipo oeste e para as amostras atipicas de virus leste como a amostra brasileira que isolamos em São Paulo e que estudamos longamente em trabalhos anteriores.

As provas de imunidade cruzada, realizadas pelas técnicas que examinámos no início dêste trabalho, permitem, em seguida, fixar o tipo de virus isolado.

Como se vê, são numerosas e seguras as indicações de ordem clínica que permitem evitar confusão entre as duas doenças, e ainda são do mesmo modo precisas as técnicas que não permitem, em um laboratório que trabalhe com a rotina do assunto, qualquer erro de diagnóstico. E' pois inadmissivel que novas confusões possam ainda ocorrer entre doenças de aspectos clínicos e epidemiológicos tão diversos e entre virus separados por numerosas e bem definidas características de ordem experimental e de verificação mais ou menos fácil.

10 — EPIDEMIOLOGIA

Um dos capítulos mais explorados da doença, que permite reunir importante material de noções novas, é o da epidemiologia. Todo um conjunto de dados vem permitindo construir o mecanismo de transmissão da doença e revelar os transmissores e portadores.

De início as investigações clínicas bem documentadas, reunidas principalmente depois de esclarecida a etiologia, mostraram, de modo muito nítido, o carater especial dos surtos verificados no verão, nas regiões baixas e quentes, nos vales, juntos aos cursos de água, em terrenos pantanosos ou periodicamente inundados ou irrigados. Com a entrada do frio o número dê casos vai diminuindo, ou desaparece mesmo a doença.

Nesse sentido é muito demonstrativa a documentação reunida pelo Bureau de Indústria Animal de Washington, conforme relatórios de MOHLER e de MILLER (figs. 1 a 3). Pode-se considerar na encefalomielite o período pre-epizoótico, o epizoótico e o post-epizoótico. Assim, em 1944, houve nos Estados Unidos um total de 19.590 fócos da doença, e em um total de 16.211 utilizados nos estudos de distribuição pelos meses do ano, se verifica o seguinte resultado:

Período pre-epizoótico:	Janeiro	2	fócos
	Fevereiro	6	"
	Março	10	"
	Abril	44	"
	Maio	150	"
	Total	212	"
Período epizoótico:	Junho	332	"
	Julho	1.065	"
	Agôsto	3.624	"
	Setembro	6.596	"
	Outubro	4.121	"
	Total	15.738	"
Período post-epizoótico:	Novembro	256	"
	Dezembro	5	"
	Total	261	"

Como se vê, o período das epizootias vai de junho a outubro, com 15.738 fócos; mas verifica-se aí que a doença não desaparece de todo durante os meses frios do ano.

Tem sido assinalado, além disso, que o contágio direto, embora possa realizar-se, deve ser muito raro e não explicaria a larga disseminação dos casos nos focos epizoóticos. Nos fócos humanos verificados de 1938 para cá, a mesma situação ocorria.

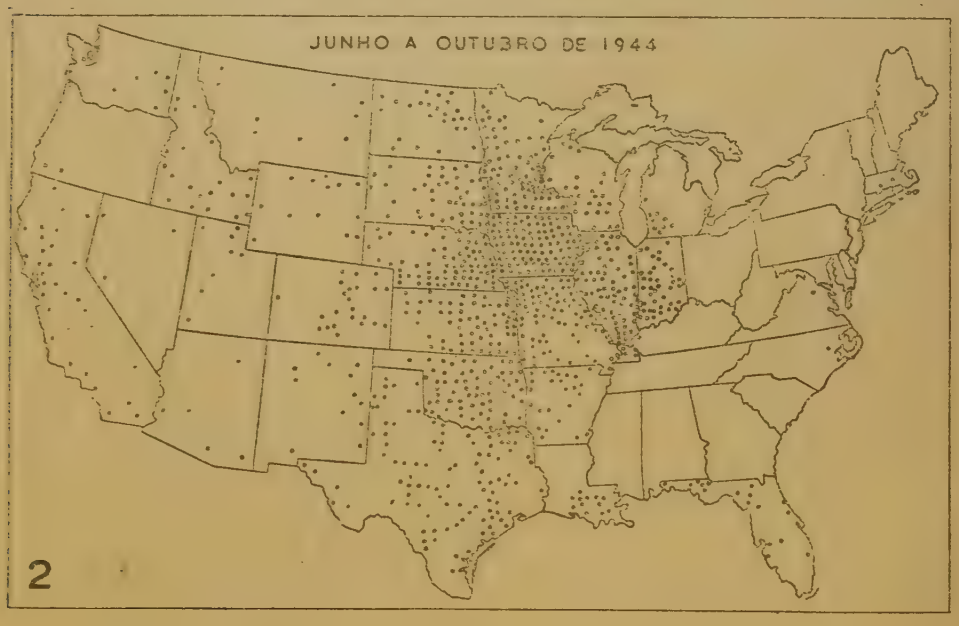
Por outro lado, numerosos ensaios experimentais e verificações na doença natural demonstravam no processo infeccioso a existência de um período febril, nitido, em curva difásica, que coincide com um período de viremia bem caracterizado, no cavalo, no homem, nos animais de laboratório, nas aves, não só na doença natural como na infecção experimental.

Êsse conjunto importante de dados: carater estival, predominância nas zonas baixas e inundadas, ausência de contágio direto, carater infeccioso, febril, com viremia, que caracterizam de modo tão marcante a clínica e a epidemiologia das encefalomielites americanas, deviam orientar as investigações para o lado dos mosquitos. Eles impressionaram de modo especial a KELSER desde 1933 e a êste autor se devem o primeiro trabalho experimental e os primeiros sucessos de transmissão da doença de cobaia a cobaia e ao cavalo pela picada de *Aedes aegypti* (LINN.). Esses trabalhos foram confirmados e numerosos ensaios foram extendidos a numerosas espécies de mosquitos do mesmo gênero. KELSER assinalava, no entanto, que provavelmente outros mosquitos deviam funcionar como transmissores, pois a doença existe em zonas onde o mosquito utilizado em seus ensaios não explicava o aparecimento dos surtos. Tentativas de isolar o virus do *A. aegypti* foram negativas.

Numerosas outras espécies de mosquitos principalmente do gênero *Aedes* foram estudadas do ponto de vista da sua capacidade de transmissão experimental da infecção, muitas com resultados positivos, até 1941. HAMMON e colaboradores forneciam assim uma relação de cerca de quinze espécies examinadas, com nove espécies do gênero *Aedes* que forneceram resultados satisfatórios: *A. aegypti*, *A. vexans*, (MEIGEN), *A. taeniorhynchus* (WIEDEMANN), *A. dorsalis* (MG.), *A. albopictus* (SKUZE), *A. sollicitans*, *A. cantator*, *A. nigromaculis* (LUDLOW) transmitem a infecção durante um período mais ou menos longo. Mas de nenhuma dessas espécies, excetuando *A. dorsalis*, o virus foi até agora isolado.

A epidemiologia é em seguida deslocada para outro gênero de mosquitos, com os trabalhos de HAMMON, REEVES, BROCKMAN e IZUMI, que isolam, em 1941, uma primeira amostra do virus oeste de *Culex tarsalis* (COQ.) capturados em zonas epizoóticas, em seguida a verificações que responsabilizavam essa espécie como transmissora de outra encefalite dada por virus: a encefalite tipo S. Luiz, estudada nos Estados Unidos.

Não é possivel entrar aqui na análise dos numerosos e extensos trabalhos realizados sôbre a epidemiologia, sem alongar demais esta



1

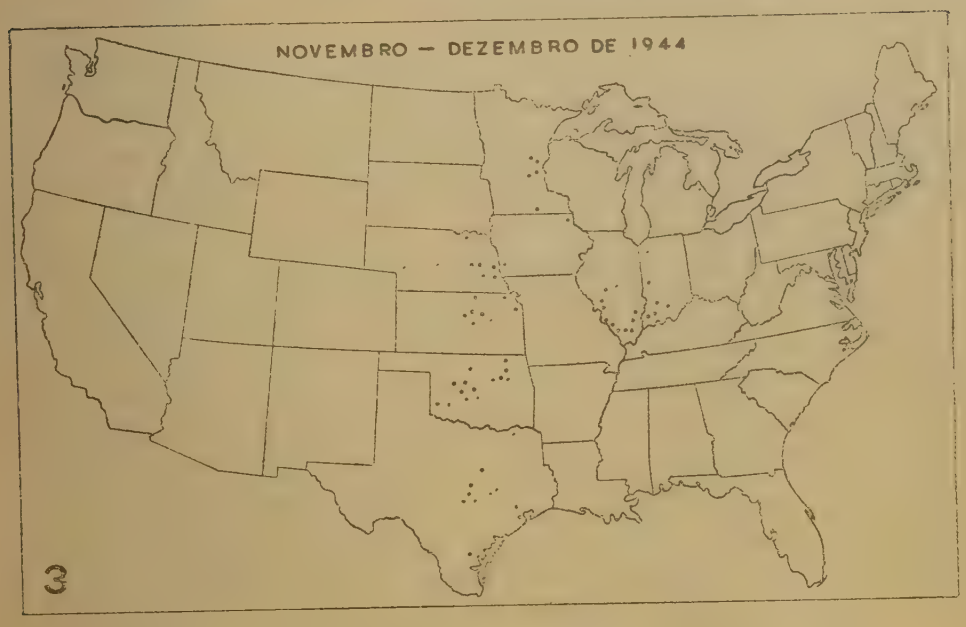
PERIODO PRE-EPIZOOTICO
FÔCOS NOTIFICADOS:

JANEIRO	2
FEVEREIRO	6
MARÇO	10
ABRIL	44
MAIO	150
TOTAL	212

2

PERIODO EPIZOOTICO
FÔCOS NOTIFICADOS:

JUNHO	332
JULHO	1.065
AGOSTO	3.624
SETEMBRO	6.596
OUTUBRO	4.121
TOTAL	15.738



PERIODO POST-EPIZOOTICO
FÓCOS NOTIFICADOS:

NOVEMBRO----	256
DEZEMBRO------	5
TOTAL	261

FIGS 1 A 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS FÓCOS DE ENCEFALOMIELITE EQUINA NOS ESTADOS UNIDOS, DURANTE 1944, DE ACORDO COM OS DIVERSOS PERIODOS DO ANO. CADA PONTO REPRESENTA UM MUNICIPIO NO QUAL HOUVE UM OU MAIS CASOS (SEG. MILLER, 1945)

exposição. Basta referir que novas amostras foram logo depois isoladas do mesmo mosquito, em experiências seriadas, e em capturas realizadas em grande extensão; que êsse mosquito transmite a infecção em condições experimentais; e que os dados epidemiológicos gerais concorrem igualmente para torná-lo um responsavel. Seu papel é, pois, no estado atual do assunto, considerado inegavel: é um transmissor provado.

Já é considerável hoje o número de amostras de virus da encefalite equina isoladas do *C. tarsalis*. Em trabalho recente, 1946, os epidemiologistas assinalam que 87 amostras de virus oeste já haviam sido isoladas de mosquitos, na grande maioria dessa espécie. De várias outras espécies de mosquitos, além disso, o virus já foi isolado pelos investigadores norte-americanos: *Culiseta inornata* (WILLISTON), *Culex pipiens* (LINN.), *Anopheles maculipennis freeborni* AITKEN, *Aedes dorsalis* e *C. stigmatosoma* DYAR.

O isolamento realizado muito recentemente, de duas amostras do virus oeste obtidas de *Aedes dorsalis por* HAMMON, REEVES e GALINDO, faz voltar de novo a atenção dos epidemiologistas para êsse gênero de mosquitos. Está demonstrado ser aquela espécie vectora em condições experimentais e é possivel que seja, em certas condições, um transmissor importante.

Os estudos epidemiológicos gerais e especiais, feitos em inquéritos nas zonas epizoóticas, ou epidêmicas, assim como as provas de sôro-neutralização realizadas em numerosas espécies animais e em numerosos exemplares de muitas espécies, tendem cada vez mais a atribuir papel importante às aves domésticas, como portadoras. O virus já foi isolado do faisão, que é atingido por epizootias graves, do pombo, de um passáro americano, o "prairie chicken", de um veado, do porco, do *Triatoma sanguesuga* (LE CONTE). Anticorpos neutralizantes do virus e, portanto, índice de infecção específica anterior, foram por outro lado encontrados numa faixa muito maior do que se poderia supor, de espécies animais, não só mamíferos como aves, domésticos e selvagens. As aves domésticas, principalmente, são responsabilizadas nesses longos inquéritos realizados pelas provas de sôro-proteção, completados pelas provas e indicações de ordem clínica e epidemiológica que acompanham o aparecimento e o desenvolvimento das ondas epizoóticas e epidêmicas.

O papel das aves domésticas parece cada vez mais evidente em face dos dados reunidos. Desde 1933 GILTNER e SHAHAN sugeriam que o pombo desempenha papel na epidemiologia, conseguindo infeta-lo com o tipo leste. Em seguida REMLINGER e BAILLY assinalam grande sensibilidade dele à amostra argentina, e nós verificámos, em 1937, que embora sensivel à amostra brasileira, em inoculações intracerebrais, o pombo nem sempre desenvolve doença fatal. Desde 1938 TEN BROECK encontrava anticorpos neutralizantes de virus em sôros de galinhas em uma fazenda, onde a doença atingia o cavalo, e insistia no papel que as aves devem desempenhar na epidemiologia. O virus é isolado do faisão por TYZZER, SELLARDS e BENNET, 1938, e do pombo por FOTHERGILL e DINGLE, 1938. Epizootias no faisão são estudadas por BEAUDETTE. Em 1941, na California, HOWITT examina 96 sôros de aves em área enzoótica, e verifica 43 resultados positivos ou 46,8%; na áreas não enzoóticas apenas 7% dos sôros são positivos.

Anticorpos neutralizantes do virus são ainda encontrados em alta porcentagem de sôros examinados: no perú 65,5%, no pato, no faisão, no pombo, 66,6%, no marreco e no ganso, em experiências de HOWITT ou de HOWITT e VAN HERICK em 1942.

Inquéritos epidemiológicos extensos, realizados no Yakima Valley, Washington, por HAMMON, GRAY, EVANS, IZUMI e LUNDY, são iniciados em maio de 1941. Ainda o resultado dêsses inquéritos revela alta porcentagem de aves domésticas que fornecem anticorpos protetores. Assim, em 74 sôros de aves domésticas, compreendendo a galinha, o pato, o marreco, o ganso, o pombo, o perú etc., 36 sôros são positivos para o virus oeste.

Entre as aves selvagens esses índices são significativamente mais baixos: em 64 exames de sôros, de pardal, de faisão, codorna e numerosas outras espécies, 16 são positivos.

No que se refere aos mamíferos, domésticos e selvagens, novos dados são reunidos e anticorpos protetores são encontrados em áreas endêmicas pelos mesmos autores. Assim, entre os domésticos, revelam anticorpos neutralizantes do virus, sôros de bovino, canino, caprino, suino, ovino e equino. Entre os selvagens os índices são mais baixos e em 74 sôros examinados apenas 4 fornecem resultados positivos.

A presença de anticorpos em numerosas espécies deve ser assim, segundo HAMMON, GRAY, EVANS e IZUMI, resultado de infecção específica, benigna ou inaparente. Êsses resultados indicariam uma extensão de reservatórios potenciais do virus, muito mais ampla do que tem sido geralmente suspeitado.

Em resumo, o resultado das provas de sôro-neutralização dêsses inquéritos daria, em linhas gerais, os seguintes índices:

entre as aves domésticas	48,7% de sôros positivos
entre as aves selvagens	20,0% de sôros positivos
entre os mamíferos domésticos . . .	32,0% de sôros positivos
entre os mamíferos selvagens	5,1% de sôros positivos

Em face dêsses dados parece que os aviários e as pequenas criações de aves em geral, em grande número nas pequenas cidades, nas áreas suburbanas e rurais, são os principais focos da infecção.

Em 1942 novos inquéritos, realizados por HAMMON, LUNDY, EVANS, BANG e IZUMI, se extendem a cerca de mil animais sangrados em áreas endêmicas e não endêmicas para provas de sôro-proteção. Nesses inquéritos são examinados 576 sôros de áreas endêmicas do Yakima Valley, sendo 284 sôros de aves, compreendendo 44 espécies, 282 sôros de mamíferos, compreendendo 29 espécies, e 10 sôros de anfíbios. Ainda aí se confirmam e completam os dados dos inquéritos anteriores segundo os quais o número de sôros positivos é expressivamente mais elevado entre animais domésticos do que entre selvagens.

Mais recentemente, em 1945, novas surpresas se assinalam no terreno da epidemiologia: em seguida ao isolamento do virus da encefalite S. Luiz do *Dermanyssus gallinae* (DE GEER), dêste mesmo artrópodo SULKIN isola o virus da encefalomielite tipo oeste em fazendas onde a doença aparece no cavalo.

Pareceria assim, em face dêsse conjunto de dados, que estamos em presença de uma epidemiologia de duplo aspecto, funcionando provavelmente o artrópodo como propagador do virus entre as aves e o mosquito como o responsavel pela extensão da doença ao cavalo, ao homem e a outras espécies.

Mas em realidade, em seguida a essa verificação de presença do virus no parasita da galinha, HAMMON e REEVES relatam, em 1946, haverem examinado, do ponto de vista de presença do virus, 100.000 exemplares de *Dermanyssus* com resultados negativos, assim como 2.430 exemplares de carrapatos *Argas persicus* (OKEN), com o mesmo resultado, enquanto a mesma técnica já forneceu 87 amostras do virus oeste isoladas de várias espécies de mosquitos. O artrópodo de galinha encontrado infectado, assinalam HAMMON e REEVES, não pode ser considerado um vector provado enquanto não fôr demonstrada sua capacidade de transmitir a infecção. É curioso ainda assinalar que a captura de numerosos exemplares do parasito de galinha encontrado infectado por SULKIN, e que fornecem resultados negativos a HAMMON e REEVES, foi realizada em galinheiros onde *Culex* infectados foram apanhados. Em certas regiões onde a doença é endêmica há cerca de 15 anos, além disso, o *Dermanyssus* não é mesmo achado. Parece que, nessas condições, o isolamento do virus do artrópodo perde grande parte de sua importância epidemiológica no estado atual do assunto.

Por outro lado, é possivel que a epidemiologia não seja realizada apenas atravez dos dois aspectos que acabamos de examinar e que outras formas de transmissão ocorram em condições naturais. SYVERTON e BEERRY, em 1937, estudam experimentalmente o possivel papel de um carrapato, o *Dermacentor andersoni* STILES, como vector do virus e de um roedor, o esquilo, como hospedeiro, baseando-se em dados epidemiológicos locais e em experiências de laboratório. O carrapato é capaz de transmitir o virus leste ao roedor e à cobaia, e a sobrevivência do virus se mantém em todas as fases de evolução do transmissor.

11 — A INFECÇÃO HUMANA.

A infecção do homem tem sido verificada sob a forma de verdadeiros surtos epidêmicos e deve ocorrer pelo mesmo mecanismo que condiciona a infecção do cavalo, isto é, por intermédio dos mosquitos. Além disso, têm-se verificado casos de infecção no laboratório, alguns de consequências fatais. A demonstração definitiva de que a doença atinge o homem, realizada em 1938, ampliou de modo consideravel a importância que o assunto já possuia. Confirmaram-se assim as primeiras indicações de MEYER em 1932, pelas quais casos humanos devem ter ocorrido na California quando o primeiro virus foi isolado do cavalo.

No laboratório a infecção humana pode ocorrer por meio de picada de agulha contaminada e por via nasal e ocular. No primeiro caso, como no segundo, o material de culturas de virus em embrião de pinto representa uma fonte perigosa de infecção, dada a sua alta concentração em virus. A rotina de preparo de vacinas é, no caso, especialmente sujeita a acidentes no trabalho de inoculação de ovos embrionados, de abertura de ovos infectados, de trituração de material e de inoculações para contrôle da DLM. Nosso cuidado nesse sentido tem sido constante e embora trabalhando há vários anos com material de grande virulência e com os três tipos, nenhum acidente se verificou. Cuidados permanentes devem ser tomados não só com essas fases da rotina como ainda com todo o trabalho com o virus. A poeira de gaiolas altamente contaminadas pode ser do mesmo modo perigosa fonte de acidentes. A via nasal é uma excelente porta de infecção no macaco, conforme assinala WYCKOFF, e os casos humanos de contaminação de laboratório o confirmam, quando partículas de poeira infectante podem ser projetadas a distância e às vezes com força, quando precauções e condições de segurança não são executadas previamente e mantidas sempre com o mesmo cuidado.

O primeiro caso humano produzido pelo virus leste, e de curso fatal, foi relatado por FOTHERGILL, DINGLE, FARBER e CONNERLY no verão de 1938, na região sudeste de Massachussets, durante a ocurrência de uma epizootia equina. WEBSTER e WRIGHT isolam logo mais quatro amostras do tipo leste. WESSELHOEFT, SMITH e BRANCH relatam logo depois outros casos e cerca de 40 são reunidos, ocasionados pelo mesmo tipo.

Ainda em 1938, HOWITT relata o primeiro caso provocado pelo tipo oeste. Novos surtos epidêmicos se verificam não só em alguns estados americanos como no Canadá e até 1941 LEAKE reunia cerca de 3.000 casos humanos de encefalite equina, sendo 195 fatais. A

grande maioria dos casos se verifica no homem que trabalha no campo e não na mulher, menos exposta, em razão do gênero de seu trabalho, às picadas de mosquitos.

Tôdos os três tipos de virus podem infectar o homem e casos humanos dados pelo virus venezuelano foram referidos mais recentemente na ilha de Trinidad, ocorridos em condições naturais.

Há, pois, a considerar, na infecção humana, não só os surtos epidêmicos estudados nos Estados Unidos e no Canadá, como os casos de infecção de laboratório ocorridos nos Estados Unidos e no Brasil. No Rio de Janeiro sete casos de infecção se deram em trabalhos com o virus venezuelano e por infecção nasal atravez de poeiras de gaiolas altamente virulentas. Tôdo os casos evoluiram para a cura e entre os sintomas se assinalaram sonolência profunda, febre, mialgias mais ou menos generalizadas e violenta dor de cabeça.

O quadro clínico da doença no homem pode ser assim resumido:

Início em geral repentino, com dôr de cabeça em geral muito forte, sonolência, astenia, náuseas, febre, dores musculares intensas, mais ou menos generalizadas ou localizadas de preferência nos membros posteriores, na região cervical, e coma. As formas clínicas, quando graves, lembram o quadro de encefalite epidêmica. O período de incubação vai de 4-5 dias até 14 dias.

O diagnóstico dos casos humanos têm sido comprovado pelo isolamento do virus do sistema nervoso central, nos casos fatais, ou pelo isolamento do virus do sangue ou ainda pela pesquisa de anticorpos no sôro sanguíneo.

Em algumas regiões surtos epidêmicos anuais têm sido verificados e estudados de perto, do ponto de vista clínico e epidemiológico, com isolamento de virus de doentes, pesquisa de anticorpos e numerosos isolamentos de virus de mosquitos, principalmente do *Culex tarsalis*. Até agora 87 amostras de virus foram isoladas de mosquitos, em estudos realizados em zonas inundadas, irrigadas e muito quentes, no Yakima Valley, em Washington, segundo HAMMON e REEVES.

12 — A PATOGENIA

A patogenia da infecção natural mostra que o trajeto do virus não se faz por via nervosa, como no caso dos virus neurotrópicos típicos, mas por via sanguínea. Durante o período febril, em duas fases, o sangue é virulento e a disseminação irregular das lesões pelas diversas zonas do cérebro, estudada de modo especial por KING e por outros autores, mostra que o trajeto do agente infeccioso se realiza pela corrente circulatória para alcançar o sistema nervoso central.

Há assim uma infecção geral, sistemica, precedendo o conjunto da infecção propriamente do sistema nervoso central. Não só o estudo topográfico das lesões nervosas conduz à interpretação da patogenia da infecção por via sanguínea: a localização de lesões nas paredes do endotelio vascular, lesões primárias, segundo KING, tambem o indica.

A patogenia tem aspectos especiais, no entanto, quando a infecção natural, ao em vez de se realizar por picada de mosquito, se processa pela mucosa nasal, quando o virus pode fazer apenas um trajeto nervoso, comprometendo logo e em primeiro logar os lobos olfativos.

13 — A INFECÇÃO EXPERIMENTAL

A infecção experimental tem sido realizada em número consiravel de espécies domésticas e selvagens, com resultados mais ou menos satisfatórios conforme a sensibilidade de cada uma delas. Além do camondongo suiço albino e da cobaia, as duas espécies mais usadas no estudo experimental, o coelho é sensivel à infecção e é muito util no preparo de sôros neutralizantes; o rato, o macaco, o gato, o boi, a cabra são sensiveis a ambos os virus norte-americanos quando se usam vias severas de infecção. Em algumas espécies a infecção típica e fatal está condicionada à via de inoculação usada, mais ou menos severa, ao tipo de virus, sendo o leste mais patogênico em geral que o oeste, à virulência da amostra em estudo e mesmo à idade dos animais. As duas vias de inoculação mais utilisadas são a via intracerebral na cobaia e no camondongo e a peritoneal no camondongo novo de 16 dias. Além dessas, a via nasal e mesmo a muscular, a subcutânea e a intradermica. O tipo leste é, em geral, mais prontamente infectante, mesmo utilisando-se as vias menos severas; mas um fator importante a considerar no caso é o que se refere ao carater da amostra de virus com que se trabalha: as amostras recentemente isoladas e as fixadas não se comportam de modo idêntico, e estas são menos infectantes por vias periféricas.

Quanto às aves, estudos especiais de vários autores têm sido realizados visando reunir dados aplicaveis à epidemiologia. Há em geral na galinha uma viremia de maior duração do que a que se verifica no cavalo e no homem. Além disso, numerosas espécies têm sido inoculadas: o pombo, muito sensivel ao virus argentino, o perú, o faisão, o ganso, o pato, e grande número as aves selvagens.

A infecção experimental do macaco *M. rhesus* tem sido praticada por via cerebral e ainda por via nasal, intraneural, endovenosa e

intralingual. Estudos especiais visando esclarecer a patogenia e a imunidade são realizados por HURST, utilizando ainda a via intradermica e a intramuscular, e por WYCKOFF.

14 — ESTUDO DO VIRUS

As experiências de filtração em membranas de colodio, realizadas por BAUER, COX e OLITSKY, 1945, com virus oeste e leste, mostram que as dimensões do virus estão entre 20-30 mμ. Ensaios de ultrafiltração realizados por TANG indicam as dimensões de 25-35 mμ. Trabalhos de ultracentrifugação de TANG, ELFORD e GALLOWAY fornecem resultados acordes com os anteriores.

Em glicerina fosfatada a 50% de pH 7,2, na geladeira a + 4°C., o material de cérebro virulento pode conservar-se como infectante até 12 meses, segundo HOWITT.

Estudos especiais de purificação do virus têm sido praticados como no caso de vários virus de plantas. Não é possivel entrar aqui na análise dêsses trabalhos. A proteina purificada fixa o complemento em presença de um sôro imune e o derivado formolado imuniza a cobaia, comportando-se, do ponto de vista antigênico, como a vacina de embrião de pinto formolada e não libertada de impurezas.

O virus é adsorvido pelo hidroxido de alumínio, é inativado pelo formol a 0,4% em 2-3 dias, à temperatura ambiente e em emulsões concentradas a 20%, conforme SHAHAN e GILTNER e COX e OLITSKY. O formol a 0,5% realiza mesmo a inativação do virus em 24 horas. A inativação pode ser ainda realizada sem perda de valor antigênico, pela exposição aos raios ultravioletas e essas duas técnicas permitem obter produtos de alto poder protetor. No momento porém só a inativação pelo formol é utilizada comercialmente no preparo de vacinas.

15 — ANATOMIA PATOLÓGICA

O estudo histológico da encefalomielite americana, iniciado por vários investigadores como UDALL, em 1912, foi cuidadosamente examinado por vários autores, na infecção natural e experimental, no cavalo, no homem e em numerosas espécies: camondongo, cobaia, macaco, aves etc. Trabalhos especiais se devem a SYVERTON e principalmente a HURST, a KING.

As lesões macroscópicas são apenas de secundário interesse, podendo-se assinalar: congestão das meninges, do cérebro, que se mostra muito mole, edemaciados; fígado hipertrofiado, icterícia e

lesões secundárias. Na infecção experimental podem surgir zonas de congestão pulmonar e mesmo de hepatisação.

As lesões microscópicas consistem em infiltrados de células linfocitárias formando acumulos perivasculares em zonas diversas do sistema nervoso central. A doença caracteriza-se por um processo inflamatório agudo, difuso, do sistema nervoso central, e mais particularmente da substância cinzenta. Nas diversas espécies animais, cavalo, macaco, cobaia e camondongo assim como no homem, em linhas gerais o quadro histológico é idêntico. As lesões são típicas de uma doença de virus neurotrópico e se aproximam das que se verificam na polimielite experimental do macaco, mas com largas diferenças no que se refere à sua distribuição.

Em 1933 SYVERTON, COX e OLITSKY referem a existência de inclusões intranucleares nas células nervosas e o estudo delas é realizado por HURST em 1934, que assinala presença de inclusões sob forma de corpúsculos oxifilos, isolados ou múltiplos, arredondados ou ovais, muito semelhantes aos que se verificam na doença de Borna. A existência de inclusões é porém ainda negada por outros histologistas, e TYZZER e SELLARDS, em 1941, consideram que existem estruturas nucleares alteradas mas nada de absolutamente significativo ou de ocurrência frequente.

16 — IMUNOLOGIA E PROFILAXIA

Desde que foi isolado o primeiro virus americano foram realizadas experiências no sentido de encontrar processos eficientes de luta contra a doença, em face de sua extensão e dos consideraveis prejuizos que vinha ocasionando. Ensaios de quimioterapia, em número limitado, nenhum resultado satisfatório puderam fornecer até o momento atual. As sulfamidas foram experimentadas com resultado negativo e o mesmo se pode dizer para o ensaio realizado com a penicilina em condições experimentais.

Existe disseminada em nosso meio a convicção de que a uroformina é um específico, mas essa impressão não tem no momento atual qualquer apoio em dados experimentais ou clínicos precisos. A uroformina foi introduzida na clínica das encefalites do cavalo por MOUSSU, ensaiada em 15 casos, quando foi estudado o surto da doença na França. Posteriormente foi preconizada na Alemanha e utilizada com sucesso na doença de Borna. Mesmo na doença de Borna, no entanto, NICOLAU e GALLWOAY não conseguem comprovar qualquer ação quimioterápica específica na infecção experimental do coelho. Ora, sabe-se hoje que nenhuma relação existe entre a doença de Borna

e as encefalites americanas, de modo que ainda que a uroformina seja eficientes naquela, isso não implica que o seja nestas. Além disso, os autores norte-americanos negam o efeito terapeutico da droga na encefalite do Continente e a literatura não registra qualquer estudo de laboratório ou de clínica demonstrando resultados definitivos. O tratamento clínico com resultados satisfatórios de alguns casos, sem diagnóstico completo de encefalite específica, ou mesmo com diagnóstico completo, nada demonstra de convincente sem um contrôle de número idêntico de não tratados; sabe-se que, de modo geral, a doença não tem obrigatoriamente um curso fatal e que 50% dos casos, em média, podem evoluir para a cura sem nenhum tratamento, ou pelo emprego de medicações sintomáticas. A eficácia da uroformina é pouco provavel em face dos dados aqui expostos e estaria ainda para ser de novo demonstrada. Convém lembrar que um tratamento específico da doença exigiria como condição essencial ao seu pleno exito, uma aplicação precoce, antes de se instalarem lesões graves e irreparaveis.

A soroterapia foi estudada como preventiva e como curativa.

Como preventivo o sôro fornece resultados mais satisfatórios e protege contra a infecção experimental quando inoculado até 24-48 horas antes dos sintomas clínicos. De acôrdo com trabalhos de COX e OLITSKY, 1936, GOCHENOUR, 1939 e de OLITSKY, SCHLESINGER e MORGAN, 1943, nunca o sôro é eficaz quando aplicado depois do aparecimento dos sintomas. Pela inoculação de virus por vias periféricas, que reproduz, em linhas gerais, condições idênticas às da infecção natural, a doença pode ser controlada quando o sôro é introduzido entre 24 e 48 horas depois da inoculação do virus, isto é, na fase ainda de incubação. Mas, mesmo assim, pode haver na cobaia infecções fatais, tardias, surgindo retardadas no momento em que cáe o título do sôro. A relativa frequência de tais infecções tardias limita o uso do sôro, conforme OLITSKY e colaboradores. Essas verificações, como se vê, restrigem, no estado atual do problema, o uso do sôro, que parece mesmo contraindicado, a não ser em casos muito especiais.

Além disso, se eficaz como preventivo, o sôro é caro, necessita, para o cavalo, a inoculação de grandes volumes e fornece imunidade de curta duração. No homem seu emprego é igualmente passivel de reservas em vista de reações às vezes graves, assinaladas por alguns autores.

Finalmente, a aplicação do sôro interfere no processo de imunidade ativa de modo que, inoculado simultaneamente com a vacina, prejudica a instalação da imunidade. Nessas condições, quando se

realiza a inoculação do sôro é necessário realizar a vacinação pelo menos 14 dias depois da aplicação do sôro, quando a capacidade neutralisante dêste, segundo GOCHENOUR, está totalmente dissipada.

Do ponto de vista clínico, pelo exposto, o interesse do sôro está hoje em plano muito secundário. Parece mesmo, em face dessas restrições de ordem experimental, clínica e prática, do custo elevado, exigência de grandes doses, que a tendência é a de abandonar o sôro. Além disso, a vacinação oferece proteção sólida, duravel e de baixo custo; para ela se orienta quase toda a profilaxia.

As primeiras experiências de vacinação, no laboratório e no campo, foram tentadas com o virus ativo inoculado por via subcutânea, incapaz de produzir doença clínica, pelo uso de amostras fixadas ou de baixa virulência e produzindo apreciavel imunidade. São bem conhecidas, no entanto, as restrições de ordem sanitária que acompanham ou podem acompanhar as vacinações com um virus ativo não suficientemente estudado do ponto de vista da instalação de portadores.

Os autores norte-americanos estudaram logo em seguida a possibilidade de imunização pelo virus inativado pelos agentes químicos e mais recentemente pelos agentes físicos. Vários inativantes químicos foram ensaiados e o formol forneceu excelentes resultados.

Em 1935 SHAHAN e GILTNER demonstram que cérebros virulentos triturados e tratados pelo formol em emulsões a 20%, fornecem um produto de apreciavel valor atigênico. Em 1936, COX e OLITSKY confirmam e completam esses primeiros estudos, e demonstram ainda que a proteção assegurada pelo virus formolado não corre por conta de frações do virus ativo, no produto formolado. O virus tratado pelo formol é seguramente inativado e reproduz em tôdos os sentidos sondados, o valor antigênico do virus ativo.

As primeiras vacinações no campo foram realizadas com um produto obtido de cérebros virulentos de cavalo, triturados, emulsionados em água fisiológica e tratados pelo formol a 0,4%.

Mas, ainda em 1935, HIGBIE e HOWITT demonstram a possibilidade de aplicação da técnica de cultura em embrião de pinto aos virus da encefalite equina. Fixaram as autoras o teor de virus nas culturas, as lesões observadas, o efeito letal do virus no embrião, e outros detalhes técnicos importantes. TEN BROECK constata logo depois mais altas concentrações do virus nas culturas e, como consequência, BEARD, FINKELSTEIN, SEALY e WYCKOFF preparam vacinas de culturas do virus em embrião de pinto inativadas pelo formol, de poder antigênico muito solido.

Dispomos assim, desde 1938, de uma excelente vacina contra a encefalomielite do cavalo; e a técnica de seu preparo está bem fixada. O alto grau de imunidade que ela assegura é atestado em provas severas realizadas em diversas espécies: no camondongo, na cobaia e no cavalo. As vacinas preparadas pela nova técnica entraram logo na rotina e tiveram sem dúvida grande valor na profilaxia da doença, permitindo, pela sua aplicação intensiva, controlar os focos permanentes. A grande superioridade das vacinas de embrião de pinto sôbre as vacinas de cérebro é realçada por EICHHORN e WYCKOFF e por tôdos os autores que delas se ocuparam. Essa superioridade reside principalmente na diferença de concentração de virus nos dois materiais utilisados como antigenos; um ovo contém, em média, tanto virus quanto o cérebro de 500 cavalos.

As cobaias vacinadas no laboratório por meio de duas doses de 0,5 cc de vacina, separadas por intervalo de uma semana, suportam 10 dias depois da segunda dose vacinante, cerca de 1.000-10.000 DLM cerebrais de virus, isto é, revelam um alto grau de imunidade em face de uma prova de infecção muito severa. Experiências em menor escala, em vista naturalmente das dificuldades materiais de trabalho, demonstram que no cavalo uma imunidade solida é obtida por meio da vacinação em duas doses de 10 cc cada uma, com uma semana de intervalo. Experiências em grande escala, no camondongo e na cobaia, fornecem resultados no mesmo sentido.

Em linhas gerais, a vacina é preparada pela inoculação do virus na membrana corioalantoide de embrião de pinto, de acôrdo com a técnica de BURNET, com modificações em geral introduzidas nos laboratórios que se ocupam da rotina. A inoculação é realizada mediante formação de uma câmara de ar artificial e em ovos embrionados de 10-12-14 dias. Obtidas as culturas do virus o material é em seguida triturado em agitador elétrico, emulsionado a 20% em água fisiológica, filtrado em gase e formolado a 0,4%. Pela permanência da emulsão formolada à temperatura ambiente a inativação do virus é realizada e um contrôle dessa inativação pode ser praticado no camondongo ou na cobaia, em inoculações por via cerebral.

Um contrôle de grande interêsse é o que visa determinar a concentração do virus nas culturas de embrião de pinto. Para êsse fim, um pequeno volume, 10 cc por exemplo, da emulsão a 20%, é retirado antes de ser realizada a adição do formol e diluido sucessivamente em água fisiológica, ou em caldo-sôro para determinação da DLM. Diluições são realizadas, em geral de 10^{-4} a 10^{-8} ou 10^{-9}, e inoculações são praticadas em duas cobaias ou em quatro camondongos

para cada diluição. EICHHORN e WYCKOFF observam que nenhuma vacina deve, a rigor, ser entregue ao consumo sem que pelo menos as culturas do virus, antes da adição do formol, matem uma cobaia de duas inoculadas, quando diluidas a 1 p. 10.000.000.

Realizada a inativação do virus, as vacinas são conservadas na geladeira, onde se processa, lentamente, uma precipitação de material, que é removido por decantação. A prova de valor antigênico pode ser realizada como já assinalámos, vacinando cobaias por meio de duas doses de 0,5 cc por via subcutânea. As cobaias assim vacinadas suportam regularmente, dois dias depois da segunda dose vacinante, 1.000-10.000 DLM cerebrais.

*

* *

Na prática, a vacinação do cavalo é realizada por meio de duas doses de 10 cc inoculadas por via subcutânea, com intervalo de uma semana. É recomendavel uma cuidadosa preparação do ponto de inoculação por meio de tintura de iodo, removida depois pelo alcool, com o objetivo de evitar infecções locais e falsas reações da vacina. É indicado, além disso, realizar a segunda dose em logar distante da primeira.

Procurando fugir ao inconveniente de reações locais ou gerais, assinaladas no curso de vacinações em grande extensão, e produzidas por proteinas da vacina, ou pelo formol, ou por defeitos de técnica de inoculação, SCHOENING e colaboradores estudaram com sucesso a vacinação intradermica, em duas doses de 1 cc cada uma, separadas pelo mesmo intervalo de uma semana. Experiências no cavalo mostram que nessas condições uma imunidade igualmente solida e duravel é obtida; a técnica tem, pois, suas indicações, embora não seja sempre de vantagens práticas em grandes efetivos. Em S. Paulo cerca de 2.000 vacinações foram realizadas recentemente por via intradermica.

A conservação do valor antigênico das vacinas na geladeira pode ser assegurada por longos períodos. Em experiências recentes demonstramos que algumas vacinas conservam o seu valor inalterado ao cabo de 50 meses de geladeira. É conveniente assegurar sua conservação em vidros neutros e bem fechados. A temperatura ambiente elas devem ser mantidas em logar fresco, ao abrigo da luz; nesse caso a conservação é reduzida a um mês.

A duração da imunidade deve variar de acôrdo com a espécie animal, sendo menos longa no camondongo. Na cobaia e no cavalo, práticamente, a imunidade alcança um ano. As vacinações devem ser

pois renovadas anualmente nos focos epizoóticos e devem ser praticadas antes do período epizoótico, isto é, um mês antes do aparecimento dos surtos.

Só nos Estados Unidos, assinala MOHLER, 461.981 animais foram vacinados em 1941 com vacinas formoladas de embrião de pinto, 600.000 em 1943 e 800.000 em 1944. As estatísticas procurando conhecer o valor profilático da vacina não podiam deixar de fornecer resultados satisfatórios. Baseadas em 242.650 vacinações realizadas elas indicam, em conjunto, um índice de incidência de 0,2‰ em vacinados, contra 2,9‰ em não vacinados; em face dêsses dados gerais, a incidência seria, pois, quatorze vezes maior entre os não vacinados.

Os insucessos atribuidos, sem razão séria, à vacina aplicada por via subcutânea, devem correr por conta de vários fatores entre os quais convém assinalar:

1 — Vacinação realizada com vacinas de um tipo, quando outro é o tipo de virus que grassa na região.

2 — Vacinação realizada por leigos, e falhas mais ou menos graves insinuadas em sua aplicação.

3 — Vacinação iniciada quando a doença já está grassando, quando a indicação correta recomenda vacinar antes de início do surto.

4 — Aplicação de uma única dose, quando duas doses são indicadas.

SCHOENING assinala, além disso, que reações locais e mesmo gerais são às vezes ocasionadas por falhas de técnica e, nesse caso, lembra a ausência de cuidados de asepsia em torno do ponto de incoulação, produzindo infecções locais e secundárias.

O relatório de MOHLER, relativo à encefalomielite nos Estados Unidos, publicado em 1943 e examinando as vacinações até 1942, assinala que seis ou sete milhões de equideos foram inoculados desde 1938, quando foram introduzidas as vacinas de embrião de pinto.

Além disso, vacinações humanas têm sido realizadas em pessoas de laboratório que trabalham com o virus e devem ser continuadas para evitar acidentes.

Por meio de técnicas especiais de precipitação, em meio ácido por curtos períodos, a vacina pode ser parcialmente purificada, libertada de impurezas, proteinas estranhas, e mesmo do formol, substâncias responsáveis pelas reações inespecíficas, sem perda do seu valor antigênico. Nessas condições, duas doses de 0,05 cc de vacina purificada protegem regularmente a cobaia, e duas doses de 1 cc protegem

o cavalo. Repetimos essas experiências dos autores norte-americanos e, mesmo em ensaios preliminares, pode-se obter facilmente uma vacina parcialmente purificada e eficiente em experiências de proteção realizadas na cobaia.

No conjunto, as vacinas de encefalomielite sofrem, no laboratório, os testes habituais de quase tôdos os produtos antigênicos: provas de esterilidade, de inocuidade e ainda provas especiais de inativação do virus, de concentração de virus nas culturas e de valor antigênico.

Se considerarmos que em dez anos, de 1930 a 1940, morreram nos Estados Unidos cerca de um milhão de cavalos vitimados pela doença, pode-se avaliar a soma de benefícios que o conjunto dêsses trabalhos assegurou à indústria animal do País e de outras regiões do Continente, atingidas pelo mesmo mal. Se considerarmos, por outro lado, o conjunto das aquisições científicas acumuladas no assunto nestes últimos quinze anos, pode-se concluir que ele sofreu transformação profunda em quase tôdos os seus aspectos, com a regularidade de uma marcha forçada com objetivos definidos, previamente fixados, e realizados de modo quase completo.

INFECTIOUS ENCEPHALOMYELITIS OF HORSES

Abstract

The present treatise is divided into three parts, reviewing separately: the present state of the problem in Brazil; the group of encephalomyelitis as a whole; and finally attempting to condense in the third part, the present state of the problem in the Americas.

The matter is examined in accordance with the following index:

I — THE PRESENT STATE OF THE PROBLEM IN BRAZIL

1 — *Clinical definition of the epizooties in our midst. Clinical and experimental diagnosis. Identification of foci.*
2 — *Isolation of the first Brazilian strain, in 1937, in S. Paulo.*
3 — *Experiments of tissular crossed immunity.*
4 — *Experiments of crossed serum neutralisation.*
5 — *Immunological position of the Brazilian strain.*
6 — *Other foci identified in Brazil: Minas Gerais, North East of Brazil and S. Paulo.*

II — GENERAL STUDY OF THE GROUP OF ENCEPHALOMYELITIS

1 — General history of the group: 1813-1922.
2 — The Moussu and Marchand disease.
3 — The Borna disease.
4 — Relations and differences between the diseases of the group.

III — THE INFECTIOUS ENCEPHALOMYELITIS OF HORSES IN THE AMERICAS

1 — History of the disease on the Continent.
2 — Discovery of the first american virus.
3 — Development of the matter and important discoveries made.
4 — Three immunologically distinct types: western, eastern and venezuelan.
5 — Geographical distribution and economic importance.
6 — Clinical study of the disease in the horse.
7 — Clinical and experimental diagnosis.
8 — Errors in diagnosis: encephalomyelitis and rabies.
9 — Isolation of the virus.
10 — Epidemiology: general information, the role of mosquitoes as vectors, the role of birds as carriers of the virus. Isolation of the virus of other species of animals. Study of the tick as possible vector. The presence of infection in numerous species.
11 — The disease in human beings: clinical study and infection in the laboratory.
12 — Pathogenesis.
13 — Experimental infection.
14 — Study of the virus in the laboratory.
15 — Histopathology.
16 — Immunity and prophilaxy: the serum and present day restrictions in its use. The antigenic value of formolised virus. The chick embryo vaccine; subcutaneous and intradermic vaccinations.

The work is accompanied by a bibliography condensing only the principal publications relating to the problems examined in the text. A complete bibliography of the matter would involve about 400 publications.

BIBLIOGRAFIA (1)

BANG, F. — 1943 — The course of experimental infection of the chick embryo with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 77: 337-344.

BANG, F. and W. C. REEVES — 1942 — Mosquitoes and encephalitis in the Yakima Valley, Washington. *J. Inf. Dis.*, 70: 273-274.

BAUER, J. R., H. R. COX and P. K. OLITSKY — 1935 — Ultrafiltration of the virus of equine encephalomyelitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 33: 378-382.

BEARD, D., H. FINKELSTEIN and J. W. BEARD — 1941 — Repeated vaccination of man against the virus of equine encephalomyelitis *J. Immunol.*, 40: 497-507.

BEARD, J. W., H. FINKELSTEIN, and W. C. SEALY — 1938 — The ultracentrifugal concentration of the immunising principle from tissues diseased with equine encephalomyelitis. *Science*, 87: 89-90.

BEARD, J. W., H. FINKELSTEIN, W. C. SEALY and R. WYCKOFF — 1938 — Immunisation against equine encephalomyelitis with chick embryo vaccine. *Scienc*, 87: 490.

BEAUDETTE, F. R. — 1939 — Equine encephalomyelitis in avian hosts. *Proc. 43d. Ann. Meet. U. S. Live stock San. Ass.*, p. 185-201.

BEAUDETTE, F. R., J. J. BLACK and C. B. HUDSON — 1941 — Another case of equine encephalomyelitis in New Jersey pheasants. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 98: 449-450.

BECK, C. and R. WYCKOFF — 1938 — Venezuelan equine encephalomyelitis *Science*, 88: 530.

BRION, A. — 1940 — Encephalomyélite infectieuse du cheval. *Rec. Med. Vet.*, 116: 97-122.

BRUNO, B. — 1944 — Encefalomielite equina. *Diretoria de Remonta e Veterinaria.* Min. da Guerra Rio de Janeiro. 34 pp.

BURNET, F. M. — 1938 — The growth of viruses on the chorioallantois of the chick embryo. *Handbuch der Virusforschung*, Erste Hälfte: 419-446. J. Springer, Wien.

CARNEIRO, V. — 1936 — As epizootias de raiva na America e o papel dos morcegos hematófagos. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 7: 273-322.

CARNEIRO, V. — 1937 — A encefalomielite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 8: 115-134.

CARNEIRO, V. — 1939 — Equine encephalomyelitis in Brazil. *Proc. VIth. Pacific Sc. Congress*, San Francisco, Ca., 5: 251-258.

CARNEIRO, V. — 1944 — Estudos de imunidade cruzada entre o virus brasileiro da encefalomielite infecciosa do cavalo e os virus americanos — pelas provas de sôro-neutralização. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 15: 209-238.

CARNEIRO, V. — 1944 — Comportamento do virus da encefalomielite infecciosa do cavalo por inoculação na membrana coriolantoide de embrião de marreco. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 15: 331-338.

CARNEIRO, V. — 1945 — Duração da imunidade na encefalomielite infecciosa do cavalo. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 16: 353-360.

(1) A bibliografia completa do assunto deve contar mais de 400 trabalhos. Damos aqui o essencial referente ao desenvolvido nesta revista.

CARNEIRO, V. — 1945 — Conservação do valor antigênico das vacinas de encefalomielite infecciosa do cavalo. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 16: 343-352.

CARNEIRO, V. e R. CUNHA — 1943 — Estudos sôbre a encefalomielite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 14: 157-194.

CASALS, J. — 1943 — Neutralising and complement-fixing antibody production and resistance following vaccination in experimental encephalitis infection. *J. Exp. Med.*, 78: 447-463.

CASALS, J., E. C. CURNEN and L. THOMAZ — 1943 — Venezuelan equine encephalomyelitis in man. *J. Exp. Med.*, 77: 521-530.

COX, H. R. and P. K. OLITSKY — 1936 — Active immunisation of guinea pigs with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 63: 745-767.

COX, H. R. and P. K. OLITSKY — 1936 — Active immunisation of guinea pigs with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 64: 217-222.

COX, H. R. and P. K. OLITSKY — 1936 — Active immunisation of guinea pigs with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 64: 223-232.

COX, H. R., W. JELLISON and L. HUGHES — 1941 — Isolation of western equine encephalomyelitis virus from infected prairie chicken. *Publ. Health Reps.*, 56: 1905-1906.

CUNHA, R. — 1942 — Relação imunológica entre o virus da encefalomielite equina isolado na Baía e o virus rábico. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 11: 75-76.

CUNHA, R. — 1943 — Anticorpos para o virus este da encefalomielite equina em sôros de cavalos no Nordeste Brasileiro. *Rev. Bras. Biol.*, 3: 425-430.

DAVIS, W. A. — 1940 —A study of birds and mosquitoes as hosts for the virus of eastern equine encephalomyelitis. *Am. J. Hyg.*, 32: 45-59, sec. C.

DUPONT, O. — 1913 — Peste de cegar. *Rev. Zoot. Vet.*, 3: 376-378.

EICHHORN, A. and R. W. G. WYCKOFF — 1938 — Immunological studies on equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 46: 285-290.

EKLUND, C. M. and A. BLUMSTEIN — 1938 — The relation of human encephalitis to encephalomyelitis in horses. *J. Am. Med. Ass.*, 111: 1734-1735.

ERNST, W. und H. HAHN — 1926 — Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Borna-Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen und Meerschweinchen). *Münch. tierärztl. Wchnschr.*, 77: 46.

ERNST, W. und H. HAHN — 1927 — Weitere Beiträge zur Bornaschen Krankheit der Pferde und zur Frage der Aetiologie des bösartigen Katarrhalfiebers des Rindes. *Münch. tierärztl. Wchnschr.*, 78: 85.

FARBER, S., A. HILL, M. L. CONNERLY and J. H. DINGLE — 1940 — Encephalitis in infants and children caused by the virus of the eastern variety of eq. encephalomyelitis. *J. Am. Med. Ass.*, 114: 1725-1731.

FOTHERGILL, L. R. — 1940 — Human encephalitis caused by the virus of equine encephalomyelitis. *Third Int. Cong. Microbiol*, New York, p. 301.

FOTHERGILL, L. R. and J. DINGLE — 1938 — A fatal disease of pigeons caused by the virus of eastern variety of eq. encephalomyelitis. *Science*, 88: 549-550.

FOTHERGILL, L. R., J. H. DINGLE, S. FARBER and M. L. CONNERLY — 1938 — Human encephalitis caused by the virus of eastern variety of eq. encephalomyelitis. *New England J. of Med.*, 219: 411.

FOTHERGILL, L. R., M. HOLDEN and R. W. G. WYCKOFF — 1939 — Western eq. encephalomyelitis in a laboratory worker. *J. Amer. Med. Ass.*, 113: 206-207.

GILTNER, L. T. and M. S. SHAHAN — 1933 — Transmission of eq. encephalomyelitis in mammals and birds. *Science*, 78: 63-64.

GILTNER, L. T. and M. S. SHAHAN — 1933 — The immunological relationship of eastern and western strains of eq. encephalomyelitis. *Science*, 78: 587-588.

GILTNER, L. T. and M. S. SHAHAN — 1936 — The present status of infectious eq. encephalomyelitis in the United States. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 88: 363-374.

GOCHENOUR, W. — 1939 — Effect of anti-encephalomyelitis serum on subsequent production of active immunity with encephalomyelitis vaccine. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 95: 374-375.

GRAHAM, R. and L. NORMAN — 1941 — Studies on eq. encephalomyelitis. *Amer. J. Vet. Res.* 2: 430-435.

HAMMON, W. McD. — 1941 — Encephalitis in Yakima Valley. Mixed St. Louis and Western equine types. *J. Amer. Med. Ass.*, 117: 161-167.

HAMMON, W. McD. — 1943 — Encephalitis: eastern and western equine and St. Louis types, as observed in 1941 in Washington, Arizona, New Mexico and Texas. *J. Amer. Med. Ass.*, 121: 560-564.

HAMMON, W. McD., J. GRAY, F. EVANS, E. IZUMI and H. W. LUNDY — 1941 — Western equine and St. Louis encephalitis antibodies in the sera of mammals and birds from an endemic area. *Science*, 94: 305-307.

HAMMON, W. McD. and B. HOWITT — 1942 — Epidemiological aspects of encephalitis in the Yakima Valley, Washington: mixed St. Louis and western equine types. *Amer. J. of Hyg.*, 35: 163-185.

HAMMON, W. McD. and E. M. IZUMI — 1942 — A virus neutralising test, subject to standardisation: used with w. eq. encephalomyelitis, St. Louis encephalitis and mouse adapted poliomyelitis viruses. *J. of Immunol.*, 43: 149-175.

HAMMON, W. McD., H. W. LUNDY, J. A. GRAY, F. C. EVANS, F. BANG and E. M. IZUMI — 1942 — A large scale serum-neutralisation survey of certain vertebrates as part of an epidemiological study of encephalitis of the western equine and St. Louis types. *J. of Immunol.*, 44: 75-86.

HAMMON, W. McD. and W. C. REEVES — 1942 — Culex tarsalis Coq. a proven vector of St. Louis encephalitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51: 142-143.

HAMMON, W. McD. and W. C. REEVES — 1943 — Laboratory transmission of St. Louis encephalitis virus by three genera of mosquitoes. *J. Exp. Med.*, 78: 241.

HAMMON, W. McD. and W. C. REEVES — 1943 — Laboratory transmission of w. eq. encephalomyelitis virus by mosquitoes on the genera Culex and Culiseta. *J. Exp. Med.* 78: 425-434.

HAMMON, W. McD. and W. C. REEVES — 1946 — Western equine encephalomyelitis virus in the blood of experimentally inoculated chickens. *J. Exp. Med.*, 83: 163-173.

HAMMON, W. McD., W. C. REEVES, B. BROOKMAN, E. M. IZUMI and C. M. GJULLIN — 1941 — Isolation of the virus of w. equine and St. Louis encephalitis from Culex tarsalis mosquitoes. *Science*, **94**: 328-330.

HAMMON, W. McD., W. C. REEVES, B. BROOKMAN and E. M. IZUMI — 1942 — Mosquitoes and encephalitis in the Yakima Valley, Washington. *J. Infect. Dis.*, **70**: 263-266.

HAMMON, W. McD., W. C. REEVES, B. BROOKMAN and C. M. GJULLIN — 1942 — Mosquitoes and encephalitis in the Yakima Valley. *V. J. Infect. Dis.*, **70**: 278-283.

HAMMON, W. McD., W. C. REEVES and P. GALLINDO — 1946 — Epizoölogy of Western equine type encephalomyelitis: eastern Nebraska field survey of 1943 with isolation of the virus from mosquitoes. *Amer. J. Vet. Research.*, **6**: 145-148.

HAMMON, W. McD., W. C. REEVES and P. GALLINDO — 1945 — Epidemiologic studies of encephalitis in the San Joaquin Valley of California, 1943, with the isolation of viruses from mosquitoes. *Amer. J. of Hyg.*, **42**: 299-306.

HAMMON, W. McD., W. C. REEVES and E. M. IZUMI — 1942 — Mosquitoes and encephalitis in the Yakima Valley II, *J. Infect. Dis.*, **70**: 267-272.

HAMMON, W. McD., W. C. REEVES and M. GRAY — 1943 — Mosquitoes vectors and inapparent animal reservoirs of St. Louis and w. eq. encephalitis virus. *Am. J. Publ. Health.*, **33**: 201-207.

HELWIG, F. C. — 1940 — Western eq. encephalomyelitis following accidental inoculation with chick embryo virus. *J. Am. M. Ass.*, **115**: 291-292.

HIGBIE, E. and B. HOWITT — 1935 — The behavior of the virus of eq. encephalomyelitis on the chorioallantoic membrane of the developing chick. *J. of Bact.*, **29**: 399-406.

HOWITT, B. — 1934 — Certain properties of the virus of eq. encephalomyelitis. *J. Infect. Dis.*, **55**: 138-149.

HOWITT, B. — 1935 — An immunological study in laboratory animals of thirteen different strains of eq. encephalomyelitis. *J. of Immunol.*, **29**: 319-341.

HOWITT, B. — 1938 — Recovery of the virus of eq. encephalomyelitis of the brain of a child. *Science*, **88**: 455-456.

HOWITT, B. — 1938 — The Moscow 2 strain of eq. encephalomyelitis virus as compared with other strains of eq. encephalitic viruses. *J. Infect. Dis.*, **63**: 269-286.

HOWITT, B. — 1939 — Recovery of the virus of eq. encephalomielitis, western type, from human blood serum. *Science*, **89**: 541-542.

HOWITT, B. — 1941 — Relationship of Moscow 2 virus of equine encephalomyelitis to rabies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **46**: 69-73.

HOWITT, B. — 1941 — Development of neutralising antibodies to the viruses of eq. encephalomyelitis and St. Louis encephalitis in the blood and cerebrospinal fluid of man and animals, together with recovery of the St. Louis v. from the blood of monkeys. *J. of Immunol.*, **42**: 117-131.

HOWITT, B. — 1942 — Human eq. encephalomyelitis and St. Louis encephalitis in California, 1939-1941. *Amer. J. Publ. Health.*, **32**: 503-515.

HOWITT, B. and K. F. MEYER — 1934 — Tests of cross immunity between the virus of Borna disease and that of eq. encephalomyelitis. *J. Infect. Dis.*, 54: 364-367.

HOWITT, B. and W. VAN HERICK — 1941 — Neutralising antibodies against St. Louis and w. eq. encephalic viruses in horses and fowl. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 48: 247-250.

HOWITT, B. and W. VAN HERICK — 1942 — Relationship of the St. Louis and the w. eq. encephatic viruses to fowl and mammals in California. *J. Infect. Dis.*, 71: 179-191.

HURST, W. — 1934 — The histology of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 59: 529-542.

HURST, W. — 1936 — Infection of the rhesus monkey (macaca mulata) and the guinea pig with the virus of eq. encephalomyelitis. *J. Path. Bact.*, 42: 271-302.

HUTYRA, F., J. MAREK and R. MANNINGER — 1938 — Special Pathology and Therapeutics of the Diseases of Domestic Animals, 3: 309. Tindall, Baillière and Cox, London.

KELSER, R. A., — 1933 — Mosquitoes as vectors of the virus of equine encephalomyelitis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 35: 767-771.

KELSER, R. A. — 1934 — Mosquitoes as vectors of the virus of equine encephalomyelitis. *12th. Int. Vet. Congress.*, 2: 336-347.

KELSER, R. A. — 1938 — Transmission of the virus of eq. encephalomyelitis by A. taeniorrhyncus. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 92: 195-203.

KING, L. — 1938 — Studies on eastern eq. encephalomyelitis. I. *J. Exp. Med.* 68: 677-692.

KING, L. — 1939 — Studies on eastern eq. encephalomyelitis. II. *J. Exp. Med.*, 69: 675-690.

KING, L. — 1939 — Studies on eastern eq. encephalomyelitis. III. *J. Exp. Med.*, 69: 691-703.

KING, L. — 1940 — Studies on eastern eq. encephalomyelitis. IV. *J. Exp. Med.*, 71: 95-106.

KING, L. — 1940 — Studies on eastern eq. encephalomyelitis. V. *J. Exp. Med.*, 71: 107-112.

KING, L. — 1940 — Experimental encephalitis. *J. Exp. Med.*, 72: 573-593.

KING, L. — 1942 — Studies on eastern eq. encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 76: 325-334.

KITSELMAN, C. H. and A. W. GRUNDMAN — 1940 — Equine encephalomyelitis virus isolated from naturally infected Triatoma sanguisuga Le Conte. *Kansas Agrc. Exp. Sta., Tenth Bull. n.º 50*, Manhattan, Kansas.

KUBES, V. — 1943 — Relaciones immunologicas entre el virus encephalomielitico equino de Colombia y el de Venezuela. *Bol. Inst. Invest. Vet.*, 1: 155-168.

KUBES, V. — 1944 — Venezuelan type of eq. encephalomyelitis in Trinidad. *Amer. J. Vet. Res.*, 5: 30-31.

KUBES, V. y A. Diamante — 1942 — Estudios de imm. cruzada entre el virus de la encefalomielitis equina y los virus encefalomieliticos este, oeste y argentino. *Bol. Inst. Invest. Vet.*, 1: 49-79.

KUBES, V. and F. Rios — 1939 — The causative agent of infectious eq. encephalomyelitis in Venezuela. *Science*, **90**: 20-21.

KUBES, V. y F. Rios — 1939 — Datos preliminares sobre el agente etiológico de la encefalomielitis infecciosa de los equinos em Venezuela. Folheto do *Min. de Agricultura e Cria, Caracas.* 12 pp.

LARGE, A. — 1867 — Fatal epidemic among horses in North America. *The Veterinarian*, **40**: 655-660.

LEAKE, J. P. — 1941 — Epidemic of infectious encephalitis. *Pub. Health. Rep.*, **56**: 1902-1905.

LENNETTE, E. e J. FOX — 1943 — Anticorpos neutralisantes para a amostra leste de virus de encefalomielite equina no Brasil. *Mem. Inst. Osvaldo Cruz*, **38**: 85-92.

LENNETTE, E., N. KOPROWSKI — 1943 — Human infection with the Venezuelan eq. encephalomyelitis virus: eight cases acquired in the laboratory. *J. Amer. Med. Ass.*, **123**: 1088-1095.

LÉPINE, P. — 1938 — Rage in "Les ultravirus des maladies humaines" de Levaditi et Lépine. Maloine, ed., Paris, **1**: 395-488.

LIAUTARD, — 1869 — Méningite cerebro-spinale du cheval. *Rec. Med. Vet.*, **24**: 361-365.

MAGALHÃES, O. — 1939 — Encefalomielite infecciosa dos equideos. *Brasil Médico*, **53**: 949-950.

MERRILL, M., L. LACAILLADE and C. TEN BROECK — 1934 — Mosquito transmission of eq. encephalomyelitis. *Science*, **80**: 251-252.

MERRILL, M. and C. TEN BROECK — 1935 — The transmission of eq. encephalomyelitis by Aëdes aegypti. *J. Exp. Med.*, **62**: 687-695.

MEYER, K. F. — 1932 — A summary of recent studies on eq. encephalomyelitis. *Ann. Int. Med.*, **6**: 645-654.

MEYER, K. F. — 1934 — Neurotropic virus infections of the horse. *Proc. Vth. Pacific Sc. Congress*, p. 2915-2935.

MEYER, K. F., C. HARING and B. HOWITT — 1931 — The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquim Valley, 1930. *Science*, **74**: 227-228.

MEYER, K. F., C. HARING and B. HOWITT — 1931 — New knowledge of the neurotropic virus infections of the horse. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **32**: 376-389.

MEYER, K. F., F. WOOD, C. HARING and B. HOWITT — 1934 — Susceptibility of non immune, hiperimmunised horses and goats to eastern and argentine virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **32**: 56-58.

MILLER, A. W. — 1945 — Report on infectious eq. encephalomyelitis in the United States in 1944 — *U. S. Dep. of Agriculture, B. A. I.*, Washington, D. C., 4 pp.

MITCHELL, C. A., R. V. L. WALKER and P. J. G. PLUMMER — 1938 — Studies on eq. encephalomyelitis chick embryo vaccine as a protective agent. *Canad. J. Comp. Med.*, **2**: 211-222.

MOHLER, J. R. — 1938 — Report on outbreaks of infectious eq. encephalomyelitis in the United States, 1935-1937. *U.S. Dept. of Agriculture, B.A.I.*, Washington, D.C., 4 pp.

MOHLER, J. R. — 1941 — Infectious eq. encephalomyelitis in the United States in 1940. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 98: 381-383.

MOHLER, J. R. — 1941 — Brief history of infectious eq. encephalomyelitis and related affections in the United States. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 98: 451-453.

MOHLER, J. R. — 1942 — Report on infectious eq. encephalomyelitis in the United States in 1941. *U.S. Dep. Agr. B.A.I.*, Washington, D.C., 8 pp.

MOHLER, J. R. — 1943 — Rep. on infect. eq. encephalomyelitis in the United States in 1942. *U.S. Dep. Agr. B.A.I.*, Washington, D.C., 8 pp.

MOHLER, J. R. — 1943 — The incidence of eq. encephalomyelitis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 102: 454-456.

MORGAN, I. M. and P. K. OLITSKY — 1941 — Immune reponse of mice to active virus and to formalin-inactivated virus of eastern eq. encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 42: 445-454.

MORGAN, I. M., R. W SCHLESINGER and P. K. OLITSKY — 1942 — Induced resistence of the c.n.s. to experimental infection with eq. encephalomyelitis virus. *J. Exp. Med.*, 76: 357-369.

MOUSSU, R. — 1922 — Observations cliniques et recherches expérimentales sur la méningo-encéphalomyélite enzootique du cheval. *Rec. Med. Vet.*, 98: 499-511.

MOUSSU, R. — 1926 — Recherches sur certaines affections du s.n.c. des animaux domestiques. *Thèse*, Vigot Frères, Paris, 156 pp.

NICOLAU, S. and I. A. GALLOWAY — 1927 — Borna disease. *British J. Exp. Path.*, 8: 336.

NICOLAU, S. and I. A. GALLOWAY — 1928 — Borna disease and enzootic encephalomyelitis of sheep and cattle. *Special Reports series, n.º 121*, pp. 90. Med. Research Council, London.

NICOLAU, S. and I. A. GALLOWAY — 1930 — L'encéphalomyélite enzootique expérimentale, 2e. memoire. *Ann. Inst. Pasteur*, 44: 673-696.

NICOLAU, S. and I. A. GALLOWAY — 1930 — L'encéphalomyélite enzootique expérimentale, 3e. memoire. *Ann. Inst. Pasteur*, 45: 457-523.

OLITSKY, P. K. and C. HARFORD — 1938 — Intraperitoneal and intracerebral routes in serum protection tests with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 68: 173-189.

OLITSKY, P. K. and C. HARFORD — 1938 — Idem, II. *J. Exp. Med.*, 68: 761-777.

OLITSKY, P. K. and C. HARFORD — 1938 — Idem, III. *J. Exp. Med.*, 68: 779-787.

OLITSKY, P. K. and I. MORGAN — 1939 — Studies on active and passive immunity resulting from inoculations of formolised inactivated and of active virus of eq. encephalomyelitis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 95: 530-533.

OLITSKY, P. K., R. W. SCHLESINGER and I. MORGAN — 1943 — Induced resistence of the c.n.s. to experimental infection with eq. encephalomyelitis virus. *J. Exp. Med.*, 77: 359-374.

PANISSET, L. — 1936 — Méningo-encéphalo-myélite du cheval. *Rev. Gen. Med. Vet.*, 45: 193-207.

PANISSET, L. — 1936 — Méningo-encéphalo-myélite du cheval. *Rev. Gen. Med. Vet.*, 45: 257-277.

PARKER, R. F. and N. W. DIEFENDORF — 1944 — Effect of penicilin on certain viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Mel.*, 57: 351-354.

RANDALL, R. — 1940 — The preparation of eq. encephalomyelitis vaccine by the Army Veterinary School. *Vet. Bull. U.S. Army*, **34**: 7-12.

RANDALL, R. and J. W. MILLS — 1944 — Fatal encephalitis in man due to the Venezuelan virus of eq. encephalomyelitis. *Science*, **99**: 225-226.

REEVES, W. C. and W. McD. HAMMON — 1942 — Mosquitoes and encephalitis in the Yakima Valley, Washington. *J. Infect. Dis.*, **70**: 275-277.

REEVES, W. C. and W. McD. HAMMON — 1944 — Feedings habits of the proven and possible mosquito vectors of western equine and St. Louis encephalitis in the Yakima Valley, Washington. *Amer. J. of Trop. Med.*, **24**: 131-134.

REMLINGER, P. et J. BAILLY — 1936 — Transmission de l'encéphalo-myélite argentine des equidés à l'oie, au canard, à la buse et au merle. *C. R. Soc. Biol.*, **121**: 146-149.

REMLINGER, P. et J. BAILLY — 1936 — Contribution à l'étude du virus de l'encephalo-myélite des equidés. *Biol. Médicale*, **26**: 489-536.

ROSENBUSCH, F. — 1933 — Estudios etiológicos de la epizootia de encéfalomielitis de los equinos en la Argentina. *Octava reunión de la. Soc. Argentina de Pat. Reg. del Norte, out. 1933.* Santiago del Estero. p. 572-576.

ROSENBUSCH, F. — 1934 — La encefalomielitis de los yeguarizos en la Argentina es una enfermedad infecciosa. *An. Soc. Rur. Argentina*, **68**: 19-22.

ROSENBUSCH, F. — 1934 — La immunisation activa con el virus de la encefalomielitis infecciosa equina en la Argentina. *An. Soc. Rur. Argentina*, **68**: 373-376.

SCHOENING, H. W., M. S. SHAHAN, M. OSTEEN and L. T. GILTNER — 1940 — Studies on the intradermal method of vaccination against eq. encephalomyelitis. *Vet. Med.*, **35**: 377-380.

SCHWARTE, L. — 1938 — Moldy corn poisoning in horses. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **45**: 152-158.

SCHWARTE, L., N. BIESTER and C. MURRAY — 1937 — A disease of horses caused by feeding moldy corn. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **43**: 76-85.

SHAHAN, M. S. and L. T. GILTNER — 1934 — Some aspects of infection and immunity in eq. encephalomyelitis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **37**: 926-934.

SHAHAN, M. S. and L. T. GILTNER — 1934 — Experimental studies on eq. encephalomyelitis formolised brain tissue vaccine. *North. Amer. Vet.*, **16**: 18-26.

SHAHAN, M. S. and L. T. GILTNER — 1935 — Eq. encephalomyelitis studies. Cross immunity tests between eastern and western types of virus. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **39**: 764-772.

SHAHAN, M. S. and L. T. GILTNER — 1943 — Identity of virus from cases of eq. encephalomyelitis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **102**: 271-275.

SHAHAN, M. S., L. T. GILTNER and O. OSTEEN — 1940 — The isolation and typing of eq. encephalomyelitis virus. *Cornell Vet.*, **30**: 151-160.

SHAHAN, M. S., L. T. GILTNER and H. W. SCHOENING — 1938 — A review of the 1938 outbreak of infectious eq. encephalomyelitis in the United States. *Proc. 42 d. Ann. Meet. U. S. Live Stock San. Ass.*, p. 145.

SULKIN, S. E. — 1945 — Recovery of eq. encephalomyelitis virus (western type) from chicken mites. *Science*, **101**: 381-383.

SYVERTON, J. T. and G. P. BERRY — 1941 — Hereditary transmission of the western type of eq. encephalomyelitis virus in the wood tick, Dermacentor Andersoni Stiles. *J. Exp. Med.*, 73: 507-530.

TANG, F., W. ELFORD and I. A. GALLOWAY — 1937 — Centrifugations studies: IV — The megatherium bacteriophage and the viruses of equine encephalomyelitis and louping-ill. *British J. Exp. Path.*, 18: 269-275.

TAYLOR, A. R., D. G. SHARP and J. BEARD — 1943 — Isolation and properties of equine encephalomyelitis virus. *J. Infect. Dis.*, 72: 31.

TAYLOR, A. R., D. G. SHARP, H. FINKELSTEIN and J. BEARD — 1939 — Macromolecular components of chick embryo tissue diseased with the virus of equine encephalomyelitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 42: 462-464.

TAYLOR, A. R., D. G. SHARP, H. FINKELSTEIN, D. BEARD and J. W. BEARD — 1940 — Improved sequence for rapid consistent purification of equine encephalomyelitis virus protein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 43: 648-650.

TEN BROECK, C. — 1938 — Birds as possible carriers of the virus of equine encephalomyelitis. *Arch. of Path.*, 25: 759.

TEN BROECK, C., E. W. HURST and E. TRAUB — 1935 — Epidemiology of equine encephalomyelitis in the eastern United States. *J. Exp. Med.*, 62: 677-685.

TEN BROECK, C. and M. MERRILL — 1933 — A serological difference between eastern and western equine encephalomyelitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 31: 217-220.

THELER, A. et E. M. ROBINSON — 1927 — Parabotulisme des equidés. *Rev. Gen. Med. Vet.*, 36: 193-199.

TYZZER, E. and A. SELLARDS — 1941 — The pathology of equine encephalomyelitis in young chickens. *Amer. J. Hyg.* 33: 69-81, sec. B.

UDALL, D. H., — 1913 — A report of the outbreack of "cerebrospinal meningitis" (encephalitis) in horses in Kansas and Nebraska in 1912. *Cornell Vet.*, 3: 17-43.

VALLE, A. L. — 1939 — Da ocurrência da encefalomielite epizoótica nos equideos do Brasil, 47 pp. *Tese.* Baía.

VICHELESSKY, R. S., A. NASKOW, M. SHOUKHOF et V. MOUTOVINE — 1935 — Méningo-encéphalo-myélite infectieuse du cheval. *Rec. Med. Vet.*, 111: 357-364.

WEBSTER, L. T. and F. H. WRIGHT — 1938 — Recovery of eastern equine encephalomyelitis virus from brain tissue of human cases of encephalitis in Massachussets. *Science*, 88: 305-306.

WESSELHOEFT, C., E. SMITH and C. BRANCH — 1938 — Human encephalitis. Eight fatal cases, with four due to the virus of equine encephalomyelitis. *J. Am. Med. Ass.*, 111: 1735-1741.

WHEELER, J. A. — 1941 — Western equine encephalitis occuring among human beings in Kansas during the summer of 1941. *J. Amer. Med. Ass.*, 117: 1972-1973.

WILLIAMS, W. L. — 1897 — Enzootic cerebro-spinal meningitis and hog-cholera in Idaho. *14th. Amer. Rep. B. A. I., U. S. Dep. Agriculture*, p. 178-184.

WOODRUFF, A. and E. GOODPASTURE — 1931 — The susceptibility of the chorio-allantoic membrane of chick embryo to infection with the fowl-pox virus. *Amer. J. Path.*, 7: 209-222.

WRIGHT, F. H. — 1942 — Antibodies in human serum which neutralise the virus of equine encephalomyelitis. *Amer. J. Hyg.*, 36: 57-67.

WYCKOFF, R. — 1937 — Ultracentrifugal concentration of a homogeneous heavy component from tissues diseased with equine encephalomyelitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 36: 771.

WYCKOFF, R. and W. Tesar — 1939 — Equine encephalomyelitis in monkeys. *J. Imunol.*, 37: 329-343.

ZWICK, W. — 1925 — Über die infektiöse Gehirn-und Rückenmarkentzündung der Pferde. Borna-Krankheit. *Centralblatt f. Bakteriologie*, 97: 155-160.

ZWICK, W. — 1939 — Borna-Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere; in *Handbuch der Viruskrankheiten*, herausgegeben von Gildemeister, Haagen und Waldmann. Zweiter Band: 254-354.

ZWICK, W., O. SEIFRIED und J. WITTE — 1926 — Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-und Rückenmarksentzündung der Pferde. (Borna-Krankheit). *Z. Inf. Krkh. Haustiere*, 30: 42-136.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 22

Figs. *A* — *B* — *C* — *D* — Doença de Borna no cavalo. Depressão profunda, sonolência, cabeça pendida, apoiada contra a parede. Distúrbios do equilíbrio, posição anormal dos membros.

Fig. *E* — Doença de Borna. A infecção experimental do coelho por via digestiva: opistotono, contraturas generalisadas e paralisia das extremidades. Evolução em 8 dias.

Fig. *F* — Doença de Borna. A infecção experimental do coelho por via intracerebral realisada pela inoculação de material filtrado: depressão, distúrbios da sensibilidade, encefalomielite típica. (Seg. ZWICK, SEIFRIED e WITTE, 1926).

Estampa 23

Fig. *G* — "Cornstalk disease" — intoxicação experimental do cavalo pela ingestão de milho deteriorado. Depressão, incoordenação locomotora, posição normal dos membros posteriores.

Fig. *H* — Corte de cérebro de um caso de encefalomielite infecciosa produzida por virus mostrando acúmulo e infiltração perivascular de células linfocitárias. (× 200).

Fig. *I* — Corte de cérebro mostrando hemorragia e necrose produzidas pela intoxicação. (× 200). (Seg. SCHWARTE, BIESTER e MURRAY).

Estampa 24

Fig. *J* — Cérebro mostrando necrose extensa e hemorragia no hemisfério cerebral esquerdo em um caso de intoxicação.

Fig. *K* — Corte de cérebro mostrando edema e necrose produzidas pela intoxicação. (Seg. SCHWARTE, BIESTER e MURRAY).

Estampa 25

Figs. *L* — *M* — Um caso de r a i v a no cavalo: distúrbios do equilíbrio comprometendo o trem posterior e paralisia do membro anterior direito. As primeiras suspeitas foram que se tratasse de um caso de encefalomielite. A pesquisa de corpúsculos de Negri no cérebro original forneceu resultados duvidosos: formações pouco características. O isolamento do virus rábico foi realisado no camondongo e cobaia e corpúsculos de Negri típicos e em abundância foram verificados em esfregaços de cérebro dêsses animais inoculados. (Fotos por gentileza do Dr. FRANCISCO CAMARA).

Estampa 26

Fig. *N* — Encefalomielite infecciosa do cavalo: amostra brasileira de virus isolada em 1937. Sintomas cerca de 2 ½ dias depois da inoculação intracerebral de virus: febre 40,8°C., sonolência, imobilidade, posição anormal dos membros. Fotografia no primeiro dia de doença.

Fig. O — O mesmo caso anterior no segundo dia de doença: cabeça e corpo apoiados à parede, perturbações graves do equilíbrio, atitudes anormais. (Seg. V. CARNEIRO, Arch. Inst. Biol., 1937).

Estampa 27

Fig. *P* — O mesmo caso anterior na fase final da doença: a cabeça é fortemente forçada contra o sólo. (Seg. V. CARNEIRO, 1937).

Fig. *Q* — Encefalomielite experimental da cobaia: amostra brasileira de virus, inoculação intracerebral. Paralisia flácida das extremidades. (Original) (Fot. A. Federman e B. Mazza).

Fig. *R* — Encefalomielite experimental da cobaia: amostra argentina, via intracerebral. (Original) (Fot. A. Federman e B. Mazza).

Estampa 28

Fig. *S* — Encefalomielite experimental do camondongo por via intracerebral: amostra argentina. Inoculação: 19-7-39. Foto em 24-7-39. Paralisia flácida e encefalite. (Original) (Fot. A. Federman e B. Mazza).

Fig. *T* — Infecção experimental do pombo realisada por via intracerebral com a amostra brasileira de virus de encefalomielite equina: quadro típico no 7.º dia de inoculação. (V. CARNEIRO, 1937).

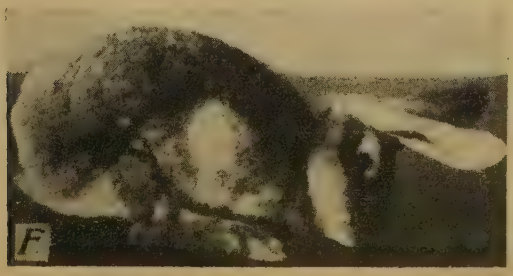
A

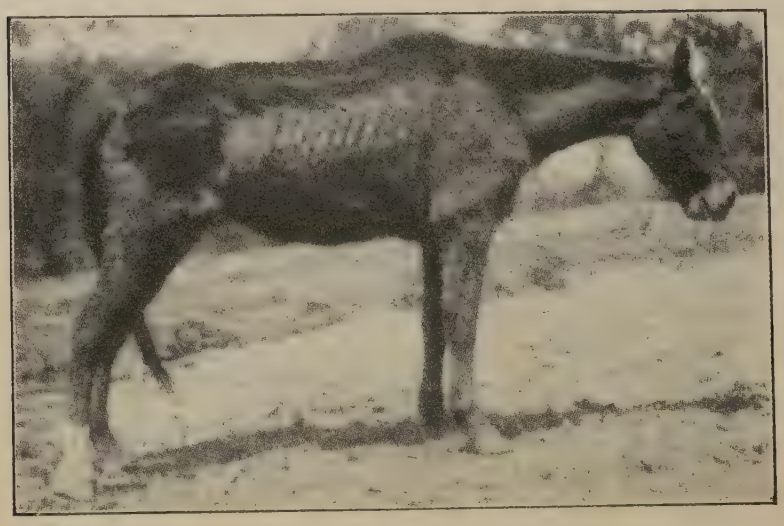
B

C

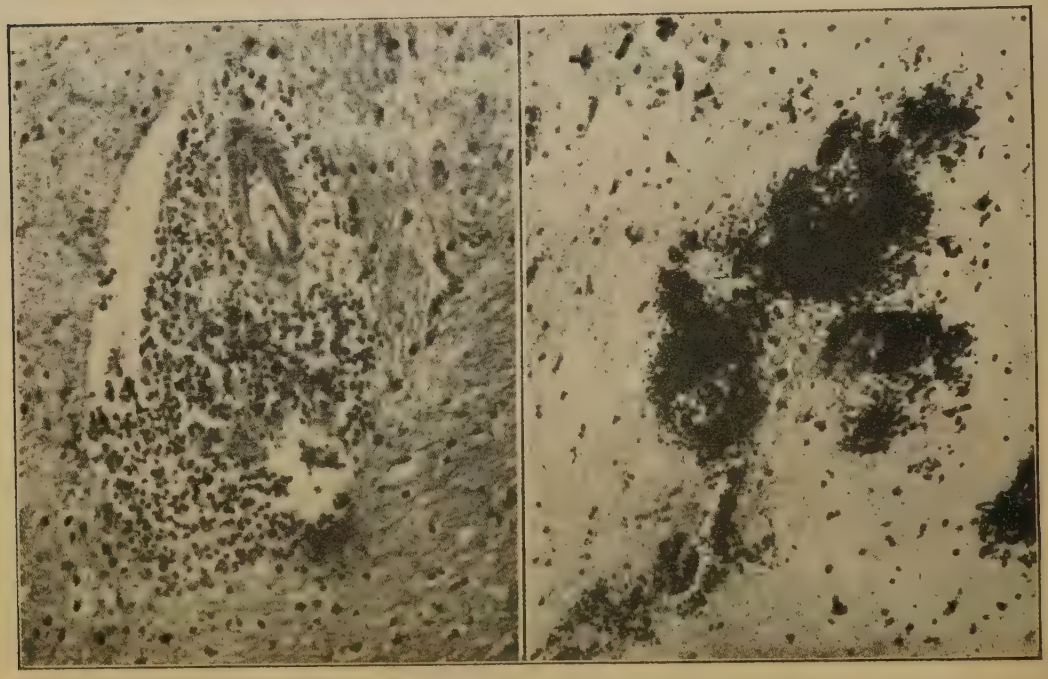
D

E

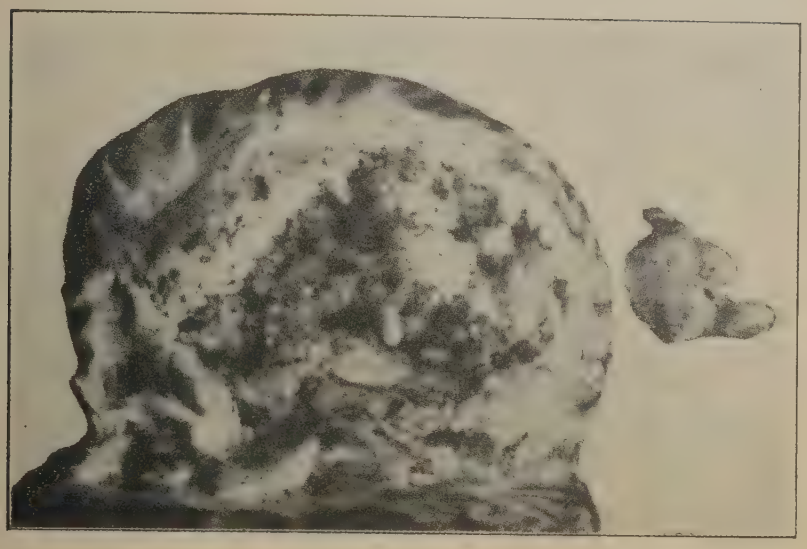

F



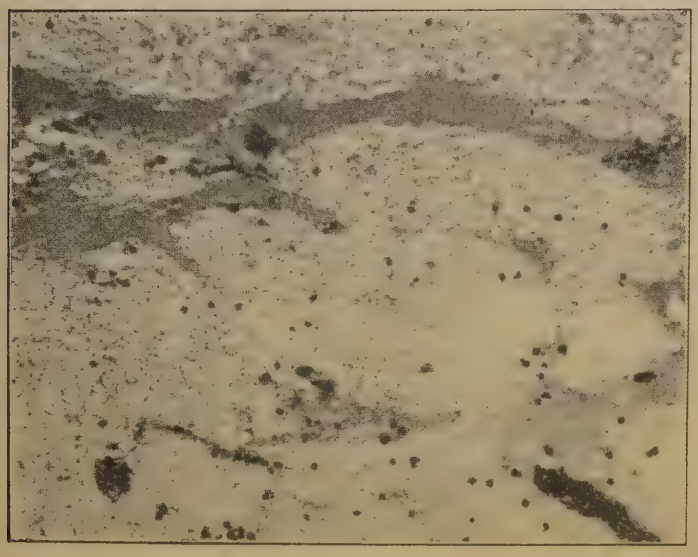
G



H *I*



J



K

L

M

O

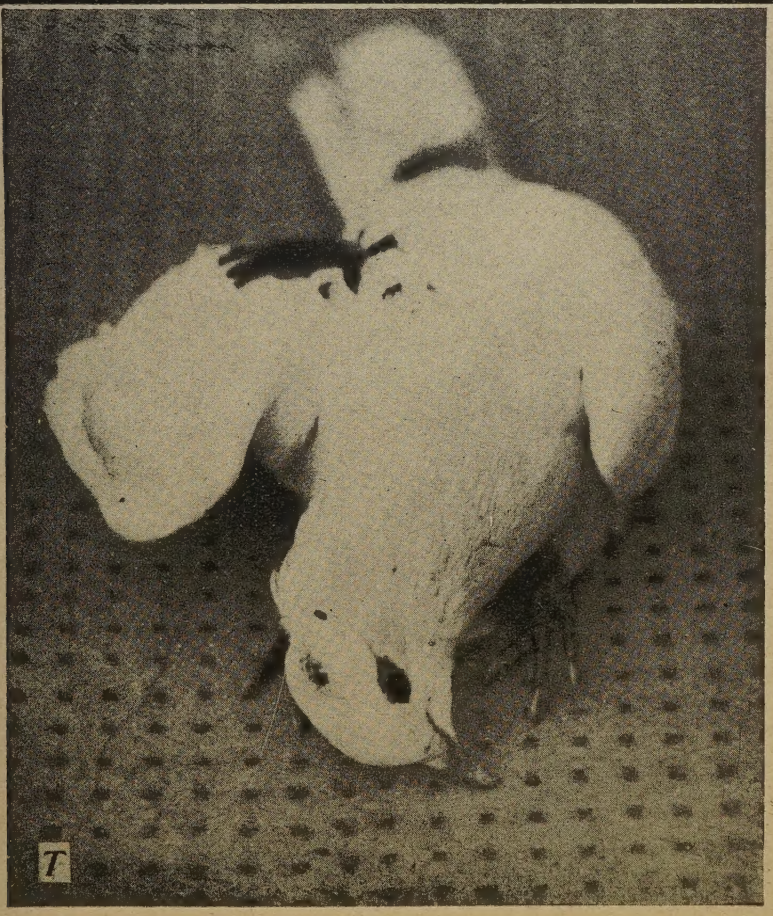
N

P

Q

R

S


T

São Paulo
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
Rua 15 de Novembro, 201
1946